

**Uso de extratos de plantas e fungos antagonistas na
limitação do crescimento de fungos patogénicos de
Mangifera indica L.**

Nuno Filipe de Abreu Freire Neto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica

Especialidade em Proteção de Plantas

Orientadores: Prof. Doutor António Maria Marques Mexia

Prof. Doutor Raimundo Manuel Cabrera Pérez

Júri:

Presidente: Professor Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa,
Professor auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Professor Doutor António Maria Marques Mexia, Professor catedrático,
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Professora Doutora Ana Maria da Costa Aldir Magro, Investigadora auxiliar,
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

2020

Agradecimentos

Ao Professor António Mexia, pela orientação, oportunidade de trabalhar um tema à minha escolha fora do ISA e pelas aulas extremamente cativantes, que sempre permitiram uma visão muito mais alargada e complexa de todos os temas agronómicos e afins.

Ao Professor Raimundo Cabrera por me receber no laboratório de Fitopatologia da Universidade de la Laguna, pela orientação, grande ajuda, disponibilidade e pela amizade.

A toda a equipa do Laboratório de Fitopatologia pelo acolhimento, partilha e ajuda

Ao Engenheiro Manolo Puerta da união de cooperativas Coplaca pela possibilidade de realizar visitas de campo

Ao Instituto Superior de Agronomia, todos os seus professores, funcionários e colegas, que influenciaram o meu percurso e contribuíram muito para a minha formação profissional e pessoal

Aos meus pais pelo carinho, pelo apoio, pelas experiências que me proporcionaram e pela formação que me deram

À minha irmã pelo carinho e amizade

Aos meus avós pelo amor e pelas histórias de outros tempos e lugares que tanto me influenciaram nas minhas escolhas

A todos os meus familiares pelo apoio incondicional

À minha amiga Maria Dias, pelos preciosos conselhos, grande ajuda e cumplicidade

Aos meus amigos Diogo Rita e Vitória Pais por estarem presentes em cada etapa de todo este percurso

A todos os amigos da vida

À Associação Internacional de Estudantes de Agricultura e seus membros espalhados por todo o mundo, pelas partilhas, oportunidades e vivências

Ao Banco Santander e ao ISA pelo prémio de incentivo ao mestrado Santander Universidades/Instituto Superior de Agronomia

Resumo

A manga é um dos frutos com maior importância a nível mundial tanto para consumo interno como produto de exportação. Vários fungos afetam esta cultura e as doenças de pós-colheita são muito importantes. *Colletotrichum gloeosporioides*, fungos da família *Botriosphaeriaceae* e *Alternaria* sp. são alguns dos mais importantes nestas condições.

O objetivo deste trabalho é estudar a ação fungistática de extratos crus de plantas da flora da Macaronésia, óleos essenciais e extratos de fungos sobre patógenos e a possibilidade de utilizar fungos antagonistas no seu controlo.

Os fungos causadores de manchas e podridões em frutos foram identificados através da observação morfo cultural, observação de estruturas reprodutivas e análise molecular de DNA.

O potencial bioativo dos extratos crus e óleos essenciais foi avaliado através da percentagem de inibição do crescimento dos fungos *in vitro* e *in vivo*. Os fungos antagonistas foram testados através de provas de cultivo dual *in vitro*.

Os fungos isolados identificados como causadores de doença foram *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum* e três isolados de *Neofusicoccum parvum*.

Os produtos testados com maior ação fungistática *in vitro* foram os extratos crus de *Mentha suaveolens* e do fungo HRO8 *Fusarium acuminatum*, endófito de *Artemisia thuscula*. Os testes *in vivo* tiveram resultados muito variáveis e devem ser repetidos com uma amostragem maior.

Nas provas de cultivo dual, os melhores resultados foram obtidos com *Trichoderma atroviride* T11 e *Trichoderma asperellum* T25 em conjunto, frente aos isolados de *Neofusicoccum parvum*, com a formação de uma zona de inibição de crescimento micelial, podendo indicar a produção de compostos secundários.

Palavras-chave: doença; Laurissilva; bioativo; fungistático; pós-colheita;

Abstract

Mango is one of the most important fruit crops worldwide both for domestic consumption and exports. Various fungi affect this crop and postharvest diseases are very important. *Colletotrichum gloeosporioides*, fungi of the family *Botriosphaeriaceae* and *Alternaria* sp. are some of the most important in these conditions.

The objective of this work is to study the fungistatic action of raw plant extracts from the Macaronesian flora, essential oils and fungal extracts on pathogens and the possibility of using antagonistic fungi in their control.

Fungi that caused fruit staining and rotting were identified through morphocultural observation, observation of reproductive structures and molecular analysis of DNA.

The bioactive potential of crude extracts and essential oils was evaluated by the inhibition percentage of fungal growth *in vitro* and *in vivo*. Antagonistic fungi were tested by dual culture *in vitro* tests.

The isolated fungi identified as causing disease were *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum* and three isolates of *Neofusicoccum parvum*.

The products tested with the highest fungistatic action *in vitro* were the raw extracts of *Mentha suaveolens* and the endofitic fungus HRO8 *Fusarium acuminatum*. The *in vivo* tests had very variable results and should be repeated with a larger sample.

In the dual culture tests, the best results were obtained with *Trichoderma atroviride* T11 and *Trichoderma asperellum* T25 together, against *Neofusicoccum parvum* isolates, with the formation of a mycelial growth inhibition zone, which may indicate the production of secondary compounds.

Key words: disease; Laurissilva; bioactive; fungistatic; post-harvest;

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Fungicidas, biopesticidas e pesticidas naturais.....	4
2.2. Principais doenças de <i>Mangifera indica</i> no arquipélago das Canárias.....	6
2.3. Ação fungistática de extratos e óleos vegetais sobre patógenos de <i>Mangifera indica</i>	8
2.4. Utilização de fungos antagonistas contra patógenos de <i>Mangifera</i>	9
2.5. Fungos endofíticos e seu potencial como agentes de protecção de plantas. Ação fungistática de extratos de fungos endófitos sobre patógenos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Origem do material vegetal.....	12
3.2. Isolamento de fungos.....	12
3.3. Conservação de fungos.....	13
3.4. Identificação de fungos.....	13
3.5. Provas de patogenicidade.....	14
3.6. Testes de limitação de crescimento com extratos crus e óleos essenciais.....	15
3.6.1. Testes <i>in vitro</i>	15
3.6.2. Análise estatística dos testes <i>in vitro</i>	18
3.6.3. Cálculo de EC ₅₀ dos extratos utilizados.....	19
3.6.4. Testes <i>in vivo</i> sobre frutos.....	20
3.6.5. Análise estatística dos testes <i>in vivo</i>	20
3.7. Testes de antagonismo com <i>Trichoderma</i> spp. – Ensaios de cultivo dual.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Identificação de fungos fitopatogénicos.....	22
4.2. Provas de patogenicidade.....	27
4.3. Provas de extratos crus de plantas e endófitos e óleos essenciais.....	28
4.3.1. Provas <i>in vitro</i>	28
4.3.2. Valores calculados de EC ₅₀	34
4.3.3. Provas <i>in vivo</i>	37
4.3.4. Comparação entre isolados de <i>Neofusicoccum parvum</i>	40
4.4. Ensaios de cultivo dual com <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	43
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
7. ANEXOS.....	53
7.1. Análise molecular de DNA.....	53
7.2. Provas de extratos crus de plantas e endófito <i>in vitro</i>	58
7.3. Provas de óleos essenciais vegetais <i>in vitro</i>	71
7.4. Provas de fungicidas químicos de referência <i>in vitro</i>	74
7.5. Provas de extratos crus de plantas e endófito e óleos essenciais <i>in vivo</i>	75
7.6. Provas de Mann-Whitney entre extratos crus de plantas e endófito e óleos essenciais e fungicidas químicos de referência.....	78
7.7. Curvas de dose-resposta e valores calculados de EC ₅₀ e EC ₉₀	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema resumo dos métodos utilizados.....	11
Figura 3.2. Fruto com sintomas de podridão.....	12
Figura 3.3. Exemplo de provas <i>in vitro</i> com extratos vegetais.....	18
Figura 4.1. Distribuição dos dados das provas <i>in vitro</i> dos fungicidas de referência, extratos crus e óleos essenciais selecionados, em boxplot.....	33
Figura 4.2. Exemplo de provas <i>in vivo</i> com extratos vegetais.....	37

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Lista dos nove principais países produtores e exportadores mundiais de manga.....	2
Quadro 3.1. Listagem dos extratos vegetais crus, óleos essenciais e o extrato de fungo endófito testados, a espécie vegetal de qual provêm, família e órgão utilizado para extração dos produtos a testar.....	16
Quadro 3.2. Várias modalidades de ensaios de acordo com o tipo de extrato e o solvente ou dispersante utilizado.....	17
Quadro 4.1.1. Descrição morfo cultural dos fungos 1, 2, 3, 4 e 5.....	23
Quadro 4.1.2. Descrição morfo cultural dos fungos 7, 8, 9, 10 e 11.....	24
Quadro 4.1.3. Observação microscópica e descrição de estruturas reprodutivas dos fungos isolados.....	25
Quadro 4.1.4. Identificação dos fungos isolados.....	26
Quadro 4.2. Provas de patogenicidade.....	27
Quadro 4.3. Extratos crus e óleos essenciais organizados por solvente ou dispersante utilizado.....	28
Quadro 4.4.1. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos extratos crus testados a 1mg/mL <i>in vitro</i> para os fungos estudados.....	29
Quadro 4.4.2. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos óleos essenciais testados a 1mg/mL <i>in vitro</i> para os fungos estudados.....	31
Quadro 4.4.3. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos fungicidas químicos testados a 1mg/mL <i>in vitro</i> para os fungos estudados.....	32
Quadro 4.5. Valores de EC50 calculados através de curvas de dose-resposta transformadas por probit.....	34
Quadro 4.6. Valores estimados, máximos e mínimos de EC50, com 95 % de confiança, e comparação entre valores de EC50 de extratos e fungicidas de referência.....	36
Quadro 4.7. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos extratos crus e óleos essenciais a 1mg/mL testados <i>in vivo</i> para os fungos estudados.....	38
Quadro 4.8.1. Valores de H e de probalidades para o teste de Kruskal-Wallis entre os resultados das provas <i>in vitro</i> dos três isolados de <i>Neofusicoccum parvum</i>	41
Quadro 4.8.2. Valores de H e de probalidades para o teste de Kruskal-Wallis entre os resultados das provas <i>in vivo</i> dos três isolados de <i>Neofusicoccum parvum</i>	42
Quadro 4.9. Ensaios de cultivo dual entre as estirpes de <i>Trichoderma</i> sp. presentes nos produtos comerciais TRIANUM P® e TUSAL® e os fungos em estudo.....	44
Quadro 7.1. Sequência de DNA das regiões ITS1 e ITS4 dos fungos isolados e espécie definitiva a que pertencem.....	53

Quadro 7.2.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 482 de <i>Vaccinium cylindraceum</i> , das provas <i>in vitro</i>	58
Quadro 7.2.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 485 de <i>Lobelia urens</i> , das provas <i>in vitro</i>	58
Quadro 7.2.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 486 de <i>Phytolacca americana</i> , das provas <i>in vitro</i>	59
Quadro 7.2.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 487 de <i>Digitalis purpúrea</i> , das provas <i>in vitro</i>	59
Quadro 7.2.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 488 de <i>Agrimonia eupatoria</i> , das provas <i>in vitro</i>	60
Quadro 7.2.6. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 489 de <i>Lythrum junceum</i> , das provas <i>in vitro</i>	60
Quadro 7.2.7. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 491 de <i>Ilex perado</i> , das provas <i>in vitro</i>	61
Quadro 7.2.8. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 492 de <i>Laurus novocanariensis</i> , das provas <i>in vitro</i>	61
Quadro 7.2.9. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 494 de <i>Apollonias barbujana</i> , das provas <i>in vitro</i>	62
Quadro 7.2.10. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 497 de <i>Prunus lusitânica</i> , das provas <i>in vitro</i>	62
Quadro 7.2.11. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 500 de <i>Picconia excelsa</i> , das provas <i>in vitro</i>	63
Quadro 7.2.12. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 483 de <i>Mentha suaveolens</i> , das provas <i>in vitro</i>	63
Quadro 7.2.13. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 493 de <i>Ocotea foetens</i> , das provas <i>in vitro</i>	64
Quadro 7.2.14. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 496 de <i>Melia azedarach</i> , das provas <i>in vitro</i>	64

Quadro 7.2.15. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 498 de <i>Myrica faya</i> , das provas <i>in vitro</i>	65
Quadro 7.2.16. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 499 de <i>Persea indica</i> , das provas <i>in vitro</i>	65
Quadro 7.2.17. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 178 de <i>Argyranthemum frutescens</i> , das provas <i>in vitro</i>	66
Quadro 7.2.18. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 182 de <i>Artemisia thuscula</i> , das provas <i>in vitro</i>	66
Quadro 7.2.19. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 209 de <i>Argyranthemum broussonetii</i> , das provas <i>in vitro</i>	67
Quadro 7.2.20. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 358 de <i>Argyranthemum frutescens</i> , das provas <i>in vitro</i>	67
Quadro 7.2.21. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 453 de <i>Hedychium gardnerianum</i> , das provas <i>in vitro</i>	68
Quadro 7.2.22. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 454 de <i>Solanum mauritianum</i> , das provas <i>in vitro</i>	68
Quadro 7.2.23. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 508 de <i>Persea indica</i> , das provas <i>in vitro</i>	69
Quadro 7.2.24. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 775 de <i>Artemisia thuscula</i> , das provas <i>in vitro</i>	69
Quadro 7.2.25. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 808 de <i>Artemisia thuscula</i> , das provas <i>in vitro</i>	70
Quadro 7.2.26. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 1149 de <i>Nicotiana glauca</i> , das provas <i>in vitro</i>	70
Quadro 7.2.27. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 1123 do fungo endófito HRO8 <i>Fusarium acuminatum</i> , das provas <i>in vitro</i>	71
Quadro 7.3.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 994 de <i>Hyptis suaveolens</i> , das provas <i>in vitro</i>	71

Quadro 7.3.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 995 de <i>Melaleuca</i> sp., das provas <i>in vitro</i>	72
Quadro 7.3.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 996 de <i>Ocimum bacilliscus</i> , das provas <i>in vitro</i>	72
Quadro 7.3.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 997 de <i>Callistemon</i> sp., das provas <i>in vitro</i>	73
Quadro 7.3.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 998 de <i>Azadirachta indica</i> , das provas <i>in vitro</i>	73
Quadro 7.4.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o fungicida zirame, das provas <i>in vitro</i>	74
Quadro 7.4.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o fungicida metilparabeno, das provas <i>in vitro</i>	74
Quadro 7.5.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 483 de <i>Mentha suaveolens</i> , das provas <i>in vivo</i>	75
Quadro 7.5.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 808 de <i>Artemisia thuscula</i> , das provas <i>in vivo</i>	75
Quadro 7.5.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 1149 de <i>Nicotiana glauca</i> , das provas <i>in vivo</i>	76
Quadro 7.5.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 1123 do fungo endófito HRO8 <i>Fusarium acuminatum</i> , das provas <i>in vivo</i>	76
Quadro 7.5.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 994 de <i>Hyptis suaveolens</i> , das provas <i>in vivo</i>	77
Quadro 7.5.6. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 995 de <i>Melaleuca</i> sp., das provas <i>in vivo</i>	77
Quadro 7.5.7. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 996 de <i>Ocimum bacilliscus</i> , das provas <i>in vivo</i>	78
Quadro 7.6.1. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	78

Quadro 7.6.2. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	79
Quadro 7.6.3. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 3 <i>Penicillium digitatum</i>	79
Quadro 7.6.4. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 4 <i>Alternaria alternata</i>	80
Quadro 7.6.5. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	80
Quadro 7.7.1. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o extrato 483 de <i>Mentha suaveolens</i>	81
Quadro 7.7.2. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o extrato 1149 de <i>Nicotiana glauca</i>	82
Quadro 7.7.3. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o extrato 1123 do fungo endófito HRO8 <i>Fusarium acuminatum</i>	83
Quadro 7.7.4. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o extrato 808 de <i>Artemisia thuscula</i>	84
Quadro 7.7.5. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o óleo essencial 994 de <i>Hyptis suaveolens</i>	85
Quadro 7.7.6. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o óleo essencial 995 de <i>Melaleuca</i> sp.....	86
Quadro 7.7.7. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o óleo essencial 996 de <i>Ocimum bacilliscus</i>	87
Quadro 7.7.8. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o fungicida metilparabeno.....	88
Quadro 7.7.9. Distribuição de respostas transformadas de Probitto, utilizados para o cálculo de EC50 através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado e de EC50 e EC90 para o fungicida zirame.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO – Sulfóxido de dimetilo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FRAC – Fungicide Resistance Action Committee

ITS – Internal transcribed spacer

PCR – Polymerase chain reaction

PGA – Potato glucose agar

UE – União Europeia

UFC – Unidades de formação de colónias

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SER – *Stem End Rot*

1. INTRODUÇÃO

A mangueira, *Mangifera indica* L., originária da região compreendida entre o estado de Assam no leste da Índia e o Myanmar, sofreu ao longo dos anos uma difusão por todo o mundo tropical, na qual os descobrimentos portugueses e espanhóis tiveram particular importância (Yadav *et al.*, 2017). No século XVIII chegou às ilhas Canárias, onde actualmente é produzida em cinco das sete ilhas do arquipélago - Gran Canaria, Tenerife, la Palma, la Gomera e el Hierro - ocupando um total de cerca de 350 hectares de pomares instalados ISTAC, 2018. No início do século XX é introduzida na Flórida onde é feita uma selecção de variedades que ainda hoje são das mais utilizadas em todo o mundo, como 'Haden', 'Tommy Atkins', 'Kent', 'Keitt', 'Palmer', entre muitas outras (Rey *et al.*, 2004).

No final do século XX começa a ser explorada em locais de clima subtropical que se consideram marginais para a cultura, como Israel e a costa sul de Espanha, nos distritos de Málaga e Granada, onde tem sofrido uma grande expansão (Saúco, 1999; Martín e González, 2014).

Num contexto de alterações climáticas, com a subida da temperatura, esta poderá vir a ser uma cultura com potencial interessante em alguns locais da bacia mediterrânica e, no caso português, na região do Algarve. Por outro lado, a necessidade hídrica da cultura é semelhante à dos citrinos, bastante difundidos pela região, e com um sistema radicular bastante profundo e maior tolerância a stress hídrico, podendo ser conduzida com períodos de rega deficitária.

A manga tem uma importância considerável nos países onde é produzida pela sua rusticidade, abundância, acessibilidade e características nutritivas, complementando a dieta de muitas pessoas em países mais pobres (Andersen *et al.*, 2009).

A sua ampla distribuição mundial e aplicação de técnicas para controlo da floração (Davenport, 2007) garantem a disponibilidade desta fruta durante todo o ano nos mercados internacionais, o que lhe confere uma importância bastante considerável como produto de exportação, sendo a 5ª fruta mais exportada no mundo (Calatrava-Requena, 2014).

Os maiores países produtores e exportadores encontram-se listados por ordem no Quadro 1 (FAO, 2017). Ao analisar o Quadro 1 verifica-se que nem sempre os principais países produtores são os principais exportadores, devido ao grande consumo interno em alguns países produtores.

Quadro 1. Lista dos nove principais países produtores e exportadores mundiais de manga e respectivas quantidades produzidas e exportadas (FAO, 2017).

	Principais países produtores	Quantidade produzida (ton)	Principais países exportadores	Quantidade Exportada (ton)
1.	Índia	21822000	México	435815
2.	China	4992114	Tailândia	244480
3.	Tailândia	3791208	Brasil	179744
4.	Indonésia	3083643	Índia	172441
5.	México	2178927	Peru	162938
6.	Paquistão	2320050	Equador	58994
7.	Brasil	1897904	Paquistão	35616
8.	Nigéria	949835	Filipinas	24639
9.	Filipinas	725122	Iémen	7723

Os mercados de importação mais importantes são a União Europeia, o mercado Norte-Americano, o Asiático e com alguma importância o Médio Oriente (Saave, 2011).

Nos últimos anos esta cultura tem vindo a aumentar a sua importância, e a sua área de produção e quantidade produzida aumentaram praticamente para o dobro nos últimos 20 anos (Statista, 2017).

Os preços mundiais, por outro lado, têm-se mantido estáveis, com excepção dos frutos provenientes de sistemas de produção classificados como Biológicos, que têm sofrido um aumento considerável nos mercados da UE e EUA (Saúco, 2015).

Sendo uma cultura com uma ampla distribuição mundial está sujeita a uma grande diversidade de problemas fitossanitários a nível global. Estão referenciados cerca de 90 patógenos e 350 insectos, para além de vários ácaros e nemátodes que podem afectar a mangueira (Saúco, 1999). Alguns destes organismos têm um impacto considerável, provocando limitações às exportações, quer devido a medidas legislativas de quarentena, quer devido à diminuição da qualidade dos frutos (Yahia *et al.*, 2011).

A manga é uma fruta com reduzido poder de conservação e muitos são os fungos que podem originar estragos em pós-colheita (Vanniere *et al.*, 2013).

Num contexto de Protecção Integrada, e com a diminuição dos produtos fitossanitários disponíveis no mercado para controlo químico, existe a oportunidade de utilizar produtos de origem biológica como alternativas para controlar doenças quer de campo, quer de pós-colheita. Por outro lado, devido ao crescimento do mercado de produtos biológicos, com valorização comercial, produtos desta tipologia virão a ter uma importância crescente nos próximos anos. Extratos vegetais, óleos essenciais e fungos antagonistas poderão ser abordagens possíveis para lidar com estas doenças.

Assim, aproveitando a oportunidade de avaliar o potencial bioativo de extratos vegetais e óleos essenciais de plantas provenientes de diversas regiões, com destaque para a flora da Macaronésia Laurissilva, por ser única no mundo e com um potencial ainda pouco explorado, e de extratos de fungos endófitos sobre fungos fitopatogénicos de mangueira.

Pretende-se também estudar a interação entre estirpes de *Trichoderma* spp. e estes fungos, pela primeira vez na cultura da mangueira nas condições das ilhas Canárias.

Por outro lado os resultados obtidos poderão ser um ponto de partida para explorar estas abordagens nas condições de outros locais de produção, como o sul da Península Ibérica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungicidas, biopesticidas e pesticidas naturais

Os fungicidas constituem um grupo de pesticidas que afetam fungos, danificando as suas células ou inibindo o seu crescimento. O surgimento de fungicidas de síntese química, como alternativa ao controlo de organismos fitopatogénicos, trouxe muitos benefícios para a agricultura moderna, ao permitir aumentar significativamente a produtividade das culturas agrícolas (Martínez, 2012). No entanto, várias características negativas dos pesticidas de síntese química têm sido estudadas nos últimos anos, no que trata à sua toxicidade e impacto na saúde dos agricultores, saúde do consumidor e resíduos de pesticidas nos produtos, ecotoxicidade e impacto nas populações de organismos auxiliares, bem como o aparecimento, cada vez mais frequente de problemas de resistência dos patógenos (Amaro, 2003).

Para além dos fungicidas de síntese química, existe um grupo de produtos de origem biológica no qual se incluem os biofungicidas e outros produtos naturais, tais como extratos de plantas e óleos essenciais (Copping, 1998). Para que um produto seja classificado como biopesticida, é necessário que na sua constituição tenha um organismo vivo benéfico que auxilie no controlo de outros organismos fitopatogénicos (Thomas, 2002).

Extratos crus de plantas e de fungos e óleos essenciais são considerados produtos naturais com origem biológica mas não são classificados como biopesticidas na União Europeia.

A aprovação de novas substâncias ativas na UE é um processo complexo e demorado. Um produto normal leva entre 2,5 e 3,5 meses em avaliação e se for aprovado, será válido por um período de dez anos, após os quais poderá ser renovado por mais 15 anos. Muitos destes extratos crus, óleos essenciais e fungos antagonistas podem ser classificados como substâncias de baixo risco. Neste caso, o tempo de avaliação reduz-se para 120 dias e pode ser aprovado por quinze anos à partida, após os quais poderá ser renovado por mais quinze (Teicher, 2018).

O mercado dos biopesticidas e pesticidas de proveniência biológica extratos e óleos essenciais está em crescimento na UE e EUA. O mercado europeu representa 45 % da procura a nível global (Cosoveanu *et al.*, 2013) e tem um crescimento anual de 30 % (Mariño, 2006). Estes extratos naturais apresentam vantagens em relação aos produtos de síntese química por serem eficazes, com processos de extração pouco complicados, seguros para o ambiente e para o ser humano, e com um processo de

degradação natural mais rápido, o que diminui consideravelmente os resíduos destes produtos (Cosoveanu *et al.*, 2013).

Existem vários produtos homologados em circulação no mercado de fungicidas de origem biológica, extratos de plantas, crus ou fracionados, óleos essenciais, fungos antagonistas e extratos de fungos endófitos. Produtos como Cinnacoda® à base de extratos de óleo de canela, Zytroseed® de sementes de citrinos, Bio® 75, à base de óleo de *Thymus zygs* L., Neemate®, de extrato de Neem são alguns exemplos de produtos de origem vegetal (Cosoveanu *et al.*, 2013).

A flora da Laurissilva, típica da região da Macaronésia, onde se incluem os arquipélagos dos Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde, é muito rica em espécies endémicas cerca de 700, muitas das quais pertencentes às famílias botânicas *Lauraceae*, *Lamiaceae* e *Asteraceae*, muito ricas em compostos secundários, e com potencial ainda pouco explorado, quanto ao seu potencial bioativo (Lopez, 1998).

Jacobson (1989) definiu alguns requisitos que uma planta com potencial para ser utilizada como inseticida deve cumprir. Os mesmos princípios aplicam-se para fungicidas:

- a – segurança para as plantas e vida animal;
- b – biodegradável segurança para o ambiente;
- c – abundância em quantidade suficiente para ser explorada ou possibilidade de ser facilmente cultivada;
- d – processos de extracção de componentes bioactivos pouco complicados e bem descritos.

Uma vez que muitas das espécies estudadas são endémicas, é importante considerar o potencial da planta ser cultivada facilmente noutros locais, uma vez verificada ação bioativa dos seus compostos secundários.

2.2. Principais doenças de *Mangifera indica* no arquipélago das Canárias

As doenças mais importantes são oídio, *dieback* provocado por complexo de fungos da família Botriosphaeriaceae e problemas de pós-colheita, com uma grande importância em todo o mundo, provocando prejuízos significativos e impacto à comercialização desta fruta (Saúco, 1999).

O oídio da mangueira, causado pelo fungo *Oidium mangiferae* Berthet. amplamente difundido por todo o mundo, é uma das doenças de campo mais importantes nas regiões produtoras com clima seco (Galli *et al.*, 2008). No entanto, é facilmente controlável com acompanhamento regular das parcelas e aplicações de fungicidas de síntese química e com enxofre (Saúco, 1999). Neste trabalho não se estudou este fungo, por não existirem referências de resistências a enxofre, por este produto ser permitido em modo de produção biológica (Paulsen, 2005) e pela dificuldade em trabalhar em laboratório com *Oidium* sp., por se tratar de um fungo biotrófico (Heffer *et al.*, 2006).

Muitas das doenças pós colheita, estão associados a fungos que afectam os frutos ainda no campo ou nos quais as infecções ficam latentes até que as condições de pós-colheita se tornem favoráveis ao desenvolvimento dos fungos e progressão da doença (Diedhiou, 2014).

Colletotrichum gloeosporioides Penz. assume este comportamento e, para além de ser das doenças mais importantes em regiões de clima húmido, é a doença pós-colheita mais grave em manga em todo o mundo (Nelson, 2008).

Por se tratar de um fruto tropical, a manga deve ser conservada acima de 15 °C para que não ocorram danos por frio (Lo'ay, 2005), e humidade relativa elevada para que os frutos não desidratem (Medina *et al.*, 2002). Nestas condições, os requisitos necessários para o desenvolvimento dos fungos são cumpridos frequentemente, o que torna necessário que sejam tomadas algumas medidas de controlo fitossanitário.

Outra doença muito importante em pós-colheita caracteriza-se pela degradação do fruto a partir do pedúnculo, denominada *Stem End Rot* SER. Esta sintomatologia é causada por diferentes fungos pertencentes à família Botriosphaeriaceae que também afectam a cultura no campo (Galsurker, 2018). Este tipo de fungos apresenta normalmente um comportamento endofítico nas plantas, não afectando o hospedeiro. No entanto, em determinadas condições, causam sintomatologia de doença denominada de *dieback*, em que ocorre uma necrose descendente, o que virá a

provocar morte de ramos inteiros. Quando estes fungos afectam os frutos, durante o período de crescimento, vivem como endófitos no pedúnculo e, em condições de pós-colheita, começam a provocar a sua degradação, partindo do pedúnculo, causando a sintomatologia de *Stem End Rot* Slippers e Wingfield, 2007. Fungos mais frequentemente associados a estas doenças são *Lasiodiplodia* sp., *Dothiorella* sp., *Diplodia* sp., *Botryosphaeria* sp., *Neofusicoccum* sp., entre outros (Banik *et al.*, 1996; Galli *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2012; Plane *et al.*, 2002).

Alternaria sp. é outro fungo que afeta mangas de forma importante em pós-colheita. Após a infeção, permanece quiescente na epiderme dos frutos até ao início do amadurecimento, quando começa a degradar células e originar manchas necróticas. A infeção é facilitada por feridas na epiderme (Baños, 2014). Por essa razão, no controlo deste fungo, à semelhança de outros fungos importantes em pós-colheita, deve-se evitar danificar a epiderme dos frutos.

Outros fungos causadores de doenças de campo pouco significativas mas com impacto em pós-colheita são *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., associados a necroses e podridões que originam perdas comerciais consideráveis (Prakash, 2011).

Para controlar infeções destes fungos várias medidas são integradas. O controlo das doenças de campo é importante, diminuindo a ocorrência de infeções latentes nos frutos (Dinh, 2002). São utilizados meios de controlo físico, como banho em água entre 50 e 55 °C durante dois a cinco minutos após a colheita, de forma a eliminar fungos presentes em infeções quiescentes na epiderme e pedúnculo dos frutos. Este processo é usado a nível mundial como medida de controlo eficaz de *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita e redução significativa de outros problemas. Muito frequentemente, após os banhos térmicos realizam-se aplicações de fungicidas para reduzir infeções e evolução de doenças (Mohsan, 2011; Alemu, 2014). Os produtos benomil e carbendazime têm sido muito utilizados para o controlo de antracnose e SER, no entanto a utilização tem sido restringida ou proibida em vários países, incluindo na União Europeia (European Commission, 2020; Alkan *et al.*, 2018). Fungicidas do grupo químico dos imidazóis, como procloraz e imazalil, controlam o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, e fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis, como tiabendazol, conseguem controlar fungos da família *Botryosphaeriaceae*, causadores de SER (FRAC, 2019; Santos, 2008; Alkan *et al.*, 2018).

2.3. Ação fungistática e fungicida de extratos e óleos vegetais sobre patogénios de *Mangifera indica*

Em alternativa a fungicidas de síntese química, várias são as referências à utilização de extratos e óleos essenciais de plantas com bioatividade para controlar as doenças de pós-colheita.

Extratos crus são constituídos por vários compostos extraídos a partir de plantas ou outros organismos através de um solvente que é posteriormente eliminado, em que alguns deles podem ter ação fungistática ou fungicida (Villa, 2004). Óleos essenciais são produtos aromáticos muito voláteis, obtidos através de hidrodestilação de partes de plantas, e que podem ser bioativos sobre fungos (Naeem, 2018).

Alemu *et al.* 2014, verificaram que mangas submergidas em extrato aquoso de *Ruta chalepensis* L., apesar de o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* não ter sido completamente suprimido, houve uma limitação do crescimento para 36 % de desenvolvimento da doença, em comparação com 93,4 % de frutos com sintomas no controlo em pós colheita.

Silva *et al.* 2008, apresentaram resultados promissores na utilização de extratos de *Digitalis lanata* Ehrh. e *Origanum majorana* L. contra *C. gloeosporioides*.

Extratos de sementes de *Salvia sclarea* L. e de folhas de *Salvia officinalis* L. e *Rosmarinus officinalis* L., apresentaram atividade fungicida considerável em *Alternaria* spp. (Dellavalle *et al.*, 2001).

Namsi *et al.* 2018 obtiveram elevadas percentagens de inibição de crescimento micelial e germinação de esporos de *Neofusicoccum parvum* Pennycoop & Samuels com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Ganbari 2016 verificou inibição do crescimento em *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., causadores de manchas foliares em *Mangifera indica* L., com extratos de *Azadirachta indica* A. Juss.

Artemisia spp. tem um potencial fungistático considerável contra várias espécies de fungos diferentes, como *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, entre outras (Pandey *et al.*, 2017). Cosoveanu *et al.* 2013 verificaram atividade biológica de extratos de *Artemisia thuscula* Cav. contra várias espécies de *Fusarium* sp. O potencial para explorar a ação de extratos desta espécie endémica das ilhas Canárias contra outros organismos fitopatogénicos é particularmente interessante.

2.4. Utilização de fungos antagonistas contra patógenos de *Mangifera indica*, caso de *Trichoderma* spp.

Outra abordagem para controlar agentes fitopatogénicos é a utilização de fungos antagonistas, tanto inoculando estes fungos de forma a competirem com o patógeno e controlarem o seu crescimento e dispersão (Verma *et al.*, 2007), como utilizando extratos de compostos produzidos por este tipo de fungos (Marques *et al.*, 2017).

Fungos do género *Trichoderma* são cada vez mais estudados e utilizados em sistemas agrícolas pela sua ação antagonista. Para além dos efeitos indirectos, recentemente descobertos, de interação deste tipo de fungos com as plantas, originando fenómenos de resistência adquirida de forma localizada ou sistémica, têm ação direta sobre outros fungos que podem ser patogénicos para as plantas (Harman, 2005). *Trichoderma* sp. tem a capacidade de controlar fungos patogénicos, através de competição pelo espaço e recursos, através de micoparasitismo e antibiose, através da produção e libertação de compostos secundários que inibem o desenvolvimento de outros organismos (Gajera *et al.*, 2013).

Shivakumar *et al.* 2018 verificaram em testes *in vitro* que com duas estirpes de *Trichoderma viride* Pers., T.v1 e T.v2, houve uma limitação de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* de 78 % e 75 %, respetivamente. Sudha e Narendrappa 2015 obtiveram percentagens de inibição de 62,59 % com *Trichoderma viride* T.v1 e 62.59 % com *Trichoderma koningii* Oudem.

Borges *et al.* 2018 obtiveram resultado de inibição de 100 % de crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* Pat. em testes *in vitro* com as estirpes CEN162 de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. et Nirenberg. e CEN1153 de *Trichoderma harzianum* Rifai., em que CEN162 manteve inibição de crescimento de 100 % em testes *in vivo*, em *Tectona grandis* L. Estes resultados justificam o interesse em estudar a utilização destes agentes de controlo biológico contra fungos causadores de *dieback* e *Stem End Rot*.

Segundo Sangeetha *et al.* 2009, a utilização de uma mistura de estirpes de *Trichoderma* sp. tem resultados superiores. Em ensaios para controlar a podridão da coroa em *Musa acuminata* Colla causada por *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, duas estirpes de *T. viride*, uma de *T. harzianum* Rifai. e uma de *T. koningii* Oudem. inibiram bem o crescimento dos fungos. No entanto quando aplicados em mistura foram obtidos resultados superiores, inclusive aos do

fungicida carbendazime, utilizado para o controlo de antracnose e *stem end rot* em frutos em alguns países onde a sua utilização é permitida (Bhattacharjee *et al.*, 2009).

2.5. Fungos endofíticos e seu potencial como agentes de proteção de plantas. Ação fungistática de extratos de fungos endofíticos sobre patógenos

O termo fungo endofítico refere-se a fungos capazes de ocupar tecidos de plantas aparentemente saudáveis, não causando sintomas. A relação dos endófitos com as plantas pode ser de várias naturezas: parasitismo, comensalismo ou mutualismo (Jia, 2016).

A barreira entre fungos patógenos e endofíticos por vezes não é clara, e alguns dos endófitos podem ser estirpes menos virulentas de alguns patógenos ou patógenos de outras espécies ou que afetam outras variedades da mesma espécie (Stone, 2012).

Muitos endófitos são benéficos para as plantas, formando simbioses. Estes fungos competem e produzem compostos que inibem o crescimento de outros fungos, protegendo a planta de eventuais patógenos (Trujillo, 2018).

O potencial para explorar este tipo de fungos para controlo biológico ou utilizar extratos contendo os metabolitos produzidos que têm potencial bioativo sobre outros fungos é muito grande e ainda está pouco estudado (Krohn, 2013; Deshmukh, 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 3.1 apresenta-se um esquema que sintetiza as diferentes etapas deste trabalho.

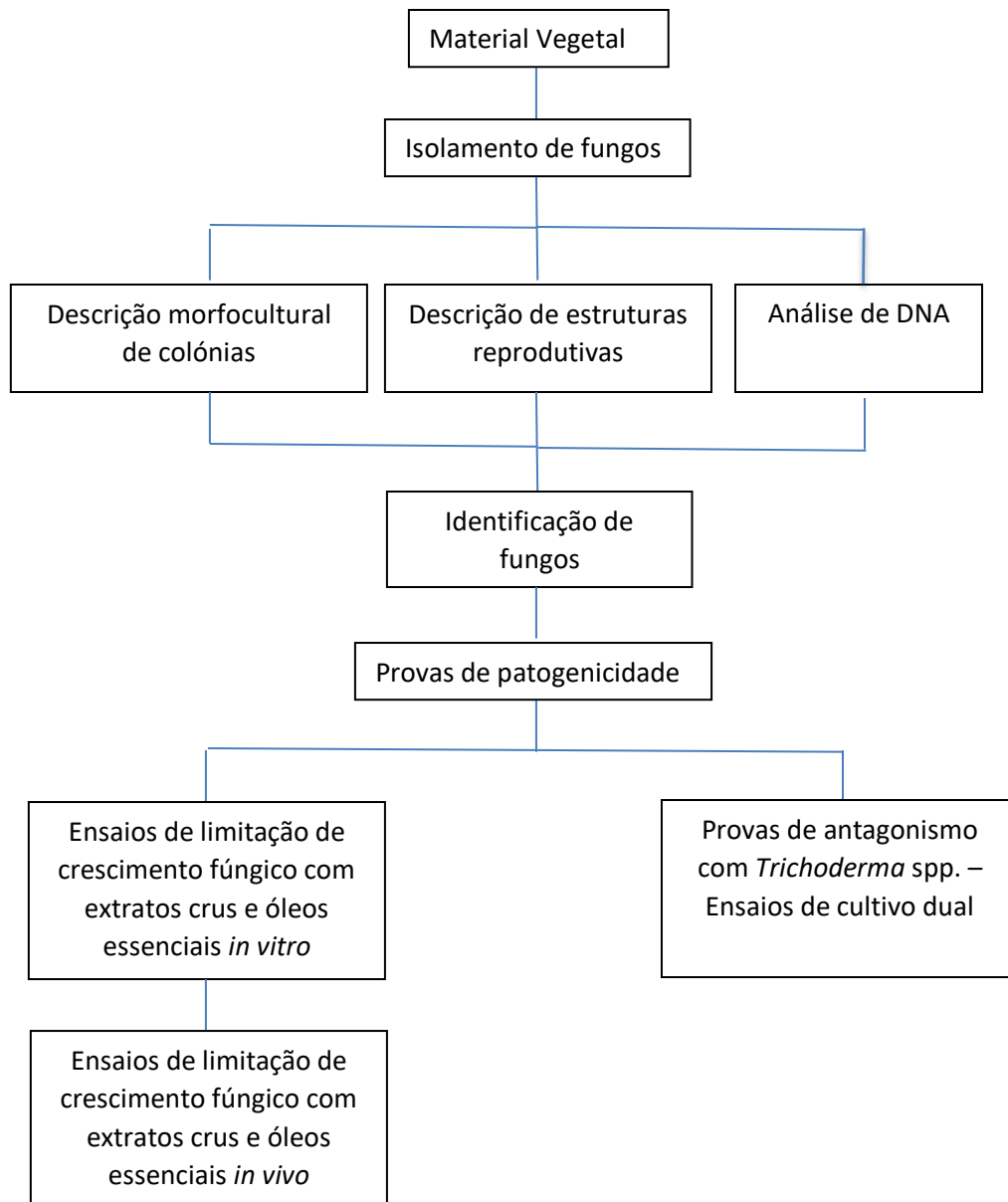


Figura 3.1. Esquema resumo dos métodos utilizados

3.1. Origem do material vegetal

Utilizaram-se frutos de *Mangifera indica* L. com manchas necróticas e podridões, obtidos em mercados locais provenientes de produção nas ilhas Canárias. Utilizaram-se mangas de diferentes variedades por não ter sido possível usar frutos de uma só variedade. Um exemplo de fruto exibindo sintomas de podridão encontra-se na Figura 3.2.



Figura 3.2. Fruto com sintomas de podridão

3.2. Isolamento de fungos

Utilizou-se meio de cultura PGA Potato Glucose Agar, 39 g/L e adicionou-se o antibiótico tetraciclina 100 µl/100mL para impedir o desenvolvimento de bactérias.

Seguiram-se os seguintes passos:

- a. limpeza dos frutos com água destilada esterilizada;
- b. limpeza do frutos com etanol 70 %;
- c. numa câmara de fluxo laminar, colocaram-se fragmentos de zona de transição com parte de tecido necrótico e parte de tecido são em caixas de Petri com meio de cultura;
- d. incubação em câmara húmida a 25° C.

Noutra abordagem, colocaram-se alguns frutos em câmara húmida de modo a promover o desenvolvimento dos fungos e induzir esporulação. Uma vez desenvolvidos e esporulados, isolaram-se em caixas de Petri esterilizadas.

Após o desenvolvimento das colónias, foram repicadas para novas caixas de Petri.

3.3. Conservação de fungos

Os fungos obtidos foram mantidos em caixas de Petri, congelados em glicerol e preservados a seco em sílica gel.

Para a manutenção de colónias em caixas de Petri, fizeram-se repicagens ao longo de todo o período de estudo.

Para a conservação em glicerol efetuaram-se cinco repetições seguindo o procedimento:

- a. colocaram-se cubos de meio com micélio num tubo de Eppendorf esterilizado;
- b. cobriram-se com 1 mL de glicerol 20 %;
- c. preservou-se no congelador a -20 °C.

Para a conservação em seco:

- a. colocou-se micélio do fungo, preferencialmente com massa de esporos, num tubo de Eppendorf;
- b. cobriu-se com 0,5 mL de água destilada esterilizada;
- c. com um agitador a 2500 rpm, agitou-se de modo a obter uma suspensão de esporos e micélio;
- d. com uma pipeta colocou-se a suspensão num tubo com sílica gel seca e esterilizada e agitou-se bem;
- e. efectuaram-se cinco repetições e conservam-se no frigorífico a 4 °C (Cañedo *et al.*, 2004).

3.4. Identificação de Fungos

A identificação foi feita com base na descrição das colónias, observações microscópicas de estruturas reprodutivas e esporos Agrios, 2005, e com recurso a técnicas moleculares de análise de DNA, asseguradas pelo laboratório de Genética da Faculdade de Biologia da Universidade de La Laguna em Tenerife, Canárias, Espanha.

A descrição morfocultural das colônias foi realizada com base na chave de identificação de fungos de Saccardo (Saccardo, 1894), e foram consideradas as seguintes características:

- a. aspeto cultural;
- b. densidade;
- c. coloração da face superior;
- d. coloração da face inferior;
- e. frente de crescimento;
- f. aspeto à transparência;
- g. zonagem;
- h. presença de pigmentos difusíveis no meio.

As observações em microscópio das estruturas reprodutivas, conidióforos e conídios, dos fungos foram feitas em água destilada esterilizada, com recurso ao microscópio ótico OBF-1 KERN & SOHN.

Para as análises de DNA, foram recolhidas quatro amostras do micélio de cada fungo e colocadas dentro de tubos Eppendorf, devidamente codificados, que se colocaram a -20°C até serem enviadas para o laboratório de genética para as análises moleculares.

Utilizou-se para a análise de DNA a região ITS Internal Transcribed Spacer dos genes que codificam para o RNA ribossomal. Na ampliação da cadeia por Reação em Cadeia de Polimerase PCR – Polymerase Chain Reaction, utilizou-se o par de primers ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'. Utilizou-se o kit comercial Mouse Tail Maxwell® 16. As sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank para identificar os fungos ao nível do género e espécie, considerando válida a identificação ao nível da espécie quando a percentagem de similaridade entre a sequência obtida e as do GenBank era igual ou superior a 97 %.

3.5. Provas de patogenicidade

As provas de patogenicidade foram feitas com frutos obtidos em mercados e comércio locais. Os frutos foram lavados com água destilada esterilizada e etanol a 70 %.

Preparou-se uma suspensão de micélio e conídios em água destilada esterilizada em tubo de Eppendorf. Raspou-se o micélio superficialmente e agitou-se com um agitador

a 2500 rpm. Procedeu-se a uma filtragem de micélio, através de um fragmento de gase. Contaram-se os esporos numa câmara de Neubauer e diluíram-se as suspensões de esporos até uma concentração na ordem de 1×10^6 esporos/mL.

Nos fungos que não esporularam utilizou-se uma suspensão de micélio, à concentração de 1×10^6 UFC/mL.

Colocaram-se quatro gotas de 25 µL da suspensão sobre frutos, utilizando como controlo água destilada esterilizada. Fizeram-se duas modalidades, uma colocando a gota sobre a epiderme do fruto intacta e outra colocando a gota sobre corte efectuado na epiderme com um bisturi.

Os frutos foram colocados numa bandeja com papel de filtro humedecido para manter HR 100 %, selada com celofane e colocada em estufa a 25 °C.

3.6. Testes de limitação de crescimento com extratos vegetais e fúngico crus e óleos essenciais

3.6.1. Testes *in vitro*

Para os testes de inibição de crescimento de fungos foram utilizados extratos vegetais, óleos essenciais e o extrato do fungo HRO8 *Fusarium acuminatum*, endófito de *Artemisia austríaca* e patenteado em Espanha como antifúngico de uso agrícola com o número CCP ES 2696982 A1 (Bopiweb, 2019). Todos os produtos se encontravam em stock no laboratório do grupo de Fitopatologia do departamento de Botânica, Ecologia e Fisiologia Vegetal da Universidade de La Laguna.

Os extratos crus de plantas foram obtidos após colheita das plantas e secagem à sombra, depois foram trituradas e colocadas em etanol e deixadas a macerar por vários dias. O etanol evapora num rotavapor a baixa pressão e recolhe-se o extrato cru (Azwanida, 2015).

No caso de extratos de fungos, após seleção dos fungos com maior poder antagonístico, nos casos em que há inibição do crescimento do patogénico por difusão de compostos no meio de cultura, são cultivados em meio de arroz e após três a cinco semanas de crescimento utiliza-se acetato de etilo para extrair os compostos produzidos pelo fungo. A solução de extração foi colocada num rotavapor para evaporar o acetado de etilo e é obtido o extrato cru (Orlandelli *et al.*, 2012).

No Quadro 3.1 encontra-se a listagem dos extratos vegetais e fúngicos crus e óleos essenciais testados, a espécie da qual provêm, família e órgão utilizado na extração.

Quadro 3.1. Listagem dos extratos vegetais crus, óleos essenciais e o extrato de fungo endófito testados, a espécie vegetal da qual provêm, família botânica e órgão utilizado para a extração

código	espécie botânica	família	órgão para extração	tipo de produto
482	<i>Vaccinium cylindraceum</i> Sm.	<i>Ericaceae</i>	parte aérea	extrato cru
485	<i>Lobelia urens</i> L.	<i>Campanulaceae</i>	parte aérea	extrato cru
486	<i>Phytolacca americana</i> L.	<i>Phytolaccaceae</i>	parte aérea	extrato cru
487	<i>Digitalis purpurea</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	parte aérea	extrato cru
488	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	<i>Rosaceae</i>	parte aérea	extrato cru
489	<i>Lythrum junceum</i> Banks et Sol.	<i>Lythraceae</i>	parte aérea	extrato cru
491	<i>Ilex perado</i> Aiton	<i>Aquifoliaceae</i>	parte aérea	extrato cru
492	<i>Laurus novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Prieto, Díaz, Costa et Aguiar	<i>Lauraceae</i>	parte aérea	extrato cru
494	<i>Apollonias barbuiana</i> Cav. Bornm	<i>Lauraceae</i>	parte aérea	extrato cru
497	<i>Prunus lusitânica</i> L.	<i>Rosaceae</i>	parte aérea	extrato cru
500	<i>Picconia excelsa</i> Aiton	<i>Oleaceae</i>	parte aérea	extrato cru
483	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	<i>Labiaceae</i>	parte aérea	extrato cru
493	<i>Ocotea foetens</i> Baill.	<i>Lauraceae</i>	parte aérea	extrato cru
496	<i>Melia azedarach</i> L.	<i>Meliaceae</i>	parte aérea	extrato cru
498	<i>Myrica faya</i> Ait.	<i>Myricaceae</i>	parte aérea	extrato cru
499	<i>Persea indica</i> Spreng.	<i>Lauraceae</i>	parte aérea	extrato cru
178	<i>Argyranthemum frutescens</i> Sch. Bip.	<i>Asteraceae</i>	raízes	extrato cru
182	<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	<i>Asteraceae</i>	ramos	extrato cru
209	<i>Argyranthemum broussonetii</i> Humphries	<i>Asteraceae</i>	inflorescência	extrato cru
358	<i>Argyranthemum frutescens</i> Sch. Bip.	<i>Asteraceae</i>	parte aérea	extrato cru
453	<i>Hedychium gardnerianum</i> Sheppard ex Ker Gawl.	<i>Zingiberaceae</i>	folhas	extrato cru
454	<i>Solanum mauritianum</i> Scop.	<i>Solanaceae</i>	folhas	extrato cru
508	<i>Persea indica</i> Spreng.	<i>Lauraceae</i>	folhas	extrato cru
775	<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	<i>Asteraceae</i>	folhas	extrato cru
808	<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	<i>Asteraceae</i>	parte aérea	extrato cru
1149	<i>Nicotiana glauca</i> Graham	<i>Solanaceae</i>	parte aérea	extrato cru
994	<i>Hyptis suaveolens</i> Kuntze	<i>Lamiaceae</i>	parte aérea	óleo essencial
995	<i>Melaleuca</i> sp. L.	<i>Myrtaceae</i>	parte aérea	óleo essencial
996	<i>Ocimum basilicum</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	parte aérea	óleo essencial
997	<i>Callistemon</i> sp.	<i>Myrtaceae</i>	parte aérea	óleo essencial
998	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	<i>Meliaceae</i>	sementes	óleo essencial
1123	HRO8 <i>Fusarium acuminatum</i> Ellis et Everh.	<i>Nectriaceae</i>	micélio	extrato cru

Em primeiro lugar, para aferir a solubilidade em água dos extratos concentrados, tentou-se dissolver 10 mg de extrato em 100 µL de água.

Prepararam-se as soluções “stock”, em tubos de Eppendorf esterilizados, dissolvendo 50 mg de extrato concentrado por 1 mL de H₂O quando hidrossolúveis, e 50 mg de extrato concentrado por 1 mL de etanol 98 % quando insolúveis em água.

Os ensaios foram realizados em várias modalidades e com diferentes controles consoante o solvente utilizado. Nos testes com óleos essenciais, adicionou-se DMSO sulfóxido de dimetilo como agente dispersante. Todos os ensaios foram feitos utilizando os produtos com a concentração de 1 mg/mL. As várias modalidades apresentam-se no Quadro 3.2.

Quadro 3.2. Várias modalidades de ensaios de acordo com o tipo de extrato e o solvente ou dispersante utilizado

Modalidades	Controlo	Prova
extratos H₂O	5000 µL PGA + tetraciclina	4900 µL PGA + tetraciclina
		100 µL solução stock
extratos etOH	4900 µL PGA + tetraciclina	4900 µL PGA + tetraciclina
	100 µL etanol 98 %	100 µL solução stock
óleos essenciais	5000 µL PGA + tetraciclina	5000 µL PGA + tetraciclina
	5 µL DMSO	5 µL DMSO
		5 µL óleo essencial

Seguindo as modalidades presentes no Quadro 3.2, com o auxílio de uma micropipeta, misturaram-se os produtos, meio de cultura e solventes ou dispersantes utilizados em tubos “microvials” graduados, e foram de seguida vertidos para caixas de Petri.

De seguida, fizeram-se cortes circulares a partir das colónias em crescimento em PGA, com o auxílio da parte posterior de uma pipeta de Pasteur. Foram colocados de forma radial equidistante oito segmentos circulares com micélio do fungo a testar, invertidos, nas caixas preparadas anteriormente.

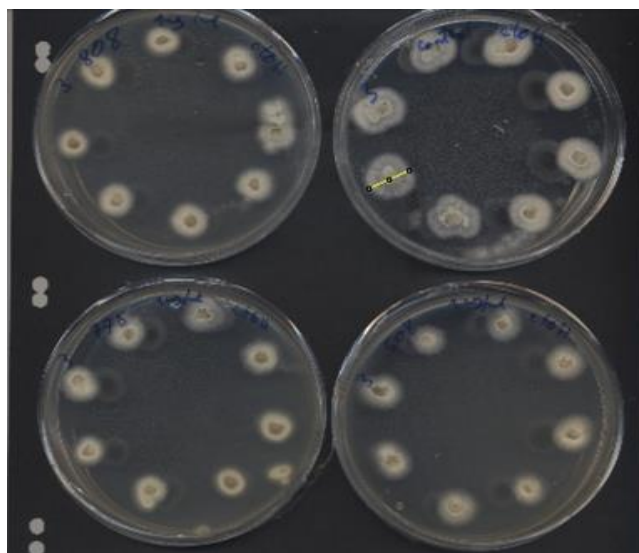


Figura 3.3. Exemplo de provas *in vitro* com extratos vegetais e medição do diâmetro com recurso ao software “ImageJ”

Ao fim de dois ou três dias, fez-se um “scanning” das novas colónias em crescimento nas caixas de teste. Na Figura 3.3 apresentam-se exemplos das provas *in vitro*. Com o auxílio do software “ImageJ”, que faz medição de pixéis, mediram-se os diâmetros das colónias.

Os resultados foram comparados estatisticamente com o controlo e foram calculadas as percentagens de inibição dos extratos e óleos essenciais testados.

3.6.2. Análise estatística dos testes *in vitro*

A análise estatística dos dados foi feita com recurso ao software SPSS 25.0.0.

Nos casos em que a análise de dados obtidos mostrava a existência de diferenças significativas a um nível de significância de 0,05, pelo procedimento Kruskal-Wallis, averiguaram-se quais os tratamentos responsáveis por essas diferenças comparando cada um com o respectivo controlo usando a prova não paramétrica U-test de Mann-

Withney, na qual Z nos dá a estatística e P a probabilidade associada de igualar ou exceder Z. Como critério para decidir se um tratamento era diferente do controle utilizou-se como convenção que se $P < 0,05$, o tratamento é diferente do controle.

As percentagens de inibição em cada tratamento foram calculadas utilizando a fórmula:

$$[C-T/C]*100$$

Com C = diâmetro médio das colônias na placa controle e T = diâmetro médio das colônias na placa com extrato ou óleo essencial.

Foram comparados os valores das percentagens de inibição e respectivos desvios padrão com os da análise estatística, e aferiram-se quais os extratos com efeito positivo na inibição do crescimento dos fungos patogênicos estatisticamente relevante (Lopez, 1998).

3.6.3. Cálculo de EC_{50} dos extratos utilizados

Nos extratos que apresentaram bioatividade nos testes *in vitro*, calculou-se a concentração que inibe em 50 % o crescimento do fungo, através de EC_{50} . O mesmo se fez com os fungicidas metilparabeno e zirame, utilizados como referência. O EC_{50} diz respeito à concentração estimada de um produto no meio, necessária para inibir os crescimento de determinado fungo em 50 % (Marei, 2018).

Foram realizadas provas *in vitro* com diferentes concentrações de extrato vegetal, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL.

O cálculo de EC_{50} com intervalo de confiança 95 % foi feito com recurso a uma análise “Probit”, que ajusta os dados obtidos à equação de uma curva do tipo dose-resposta (Hernandez, 2014).

Nos casos em que foi possível calcular um valor de EC_{50} fiável, através de um bom ajuste dos resultados a uma curva dose-resposta, compararam-se os valores de EC_{50} dos extratos com os dois fungicidas de referência utilizados, através do quociente de EC_{50} do extrato cru ou óleo essencial com EC_{50} do fungicida de referência.

3.6.4. Testes *in vivo* sobre frutos

Os extratos com melhores resultados *in vitro* foram selecionados para ser avaliada a sua eficácia *in vivo*. Os critérios de selecção foram:

- a) resultados estatisticamente diferentes do controlo;
- b) percentagens de inibição positivas;
- c) percentagens de inibição elevadas;
- d) resultados abrangentes afetam vários fungos.

Tal como efetuado para as provas de patogenicidade, os frutos foram lavados com água destilada esterilizada e limpos com etanol 70 %.

As provas foram feitas exercendo um pequeno corte na epiderme dos frutos, efectuando o tratamento com o produto a testar antes da inoculação dos fungos causadores de doença (Hernandez, 2014).

Ao fim de quatro dias, observaram-se os frutos e efetuaram-se medições das manchas provocadas pelos patogénios nas várias modalidades.

Devido à reduzida disponibilidade de frutos na altura em que foram realizados os ensaios, utilizaram-se mangas de diferentes variedades. Por essa razão, teve-se o cuidado de realizar as provas e os respetivos controlos com a mesma variedade.

3.6.5. Análise estatística dos testes *in vivo*

À semelhança dos testes *in vitro*, realizou-se o teste Kruskal-Wallis e selecionaram-se os casos em que a análise de dados apresentava diferenças significativas entre os produtos e o controlo a um nível de significância de 0,05. Realizando a prova não paramétrica U-test de Mann-Whitney, sendo Z a estatística e P a probabilidade associada de igualar ou exceder o valor de Z, para averiguar quais os tratamentos responsáveis pelas diferenças apresentadas pelo teste Kruskal-Wallis. Utilizou-se $P < 0,05$ como convenção para decidir se um tratamento era diferente do controlo.

Calcularam-se as percentagens de inibição para os testes *in vivo* utilizando a fórmula:

$$[C-T/C]*100$$

Com C = diâmetro médio das manchas nos frutos não tratados e T = diâmetro médio das manchas no frutos tratados com extratos crus e óleos essenciais.

Compararam-se os valores de percentagens de inibição e seus desvios padrão com a análise estatística e avaliou-se a atividade dos produtos testados em relação ao controlo.

3.7. Testes de antagonismo com *Trichoderma* spp. – Ensaio de cultivo dual

Para a realização dos ensaios para averiguar o potencial como agente bioativo de estirpes de *Trichoderma* sp. para limitação do crescimento dos fungos patogénicos foram utilizados os produtos comerciais TRIANUM – P®, com inóculo de *Trichoderma harzianum* T-22, e TUSAL®, com mistura de inóculo de *Trichoderma atroviride* T11 e *Trichoderma asperellum* T 25.

Em caixas Petri esterilizadas com meio de cultura PGA com tetraciclina, colocaram-se amostras de ambos os produtos para obter colónias de *Trichoderma* sp. para ser utilizadas nos ensaios.

Para realizar o potencial como agente bioativo das estirpes de *Trichoderma* sp., cortaram-se segmentos circulares perfeitos de meio com micélio do patogénio e da colónia de *Trichoderma* sp. e foram colocados em caixas de Petri com PGA e tetraciclina com uma distância de 4 cm entre os dois.

Ao fim de sete dias, foram observados os resultados e classificados de acordo com os efeitos obtidos:

0. contacto entre os fungos sem formação de zona barreira;
1. contacto entre os fungos e formação de zona de barreira escura;
2. surgimento de uma zona estreita de inibição de crescimento micelial de 1-2 mm;
3. zona de inibição de crescimento superior a 2 mm (Trujillo *et al.*, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de fungos fitopatogênicos



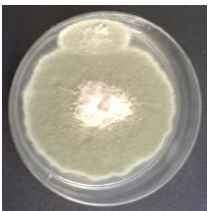
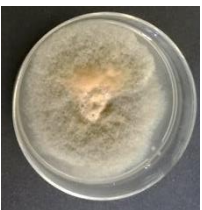


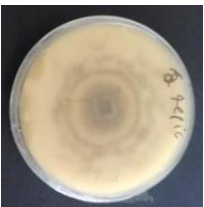

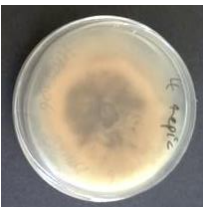

A identificação dos fungos foi realizada através de descrição morfocultural de colônias, observação de estruturas reprodutivas ao microscópio e análise molecular de DNA ribossomal.

A descrição morfocultural das colônias dos fungos 1, 2, 3, 4 e 5 encontra-se sintetizada no Quadro 4.1.1 e dos fungos 7, 8, 9, 10 e 11 no Quadro 4.1.2. Devido a um erro laboratorial, o fungo 6 corresponde a uma repicagem do fungo 1 e por essa razão, foi removido dos ensaios. Estão descritos o aspeto cultural, densidade, coloração da face superior, coloração da face inferior, frente de crescimento, aspeto à transparência, zonagem e presença de pigmentos difusíveis no meio. Também se apresentam fotografias da face superior e inferior das colônias em caixa de Petri.





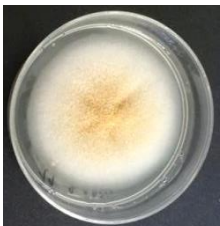


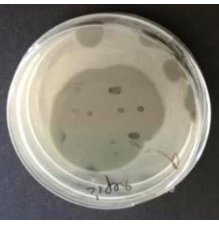
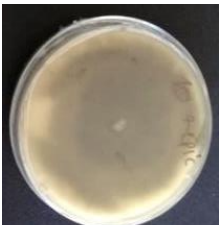
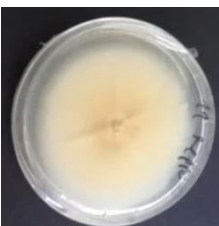
As observações microscópicas e descrição de estruturas reprodutivas apresentam-se no Quadro 4.1.3, completadas com fotografias e com referência à ampliação utilizada.

Os resultados da análise molecular de DNA apresentam-se no Quadro 7.1 em anexo, sob forma de sequência de nucleóticos que compõem a região ITS1 e ITS4 dos fungos analisados e a espécie definitiva a que pertencem.

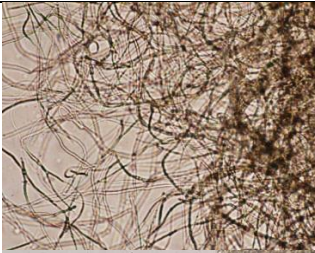
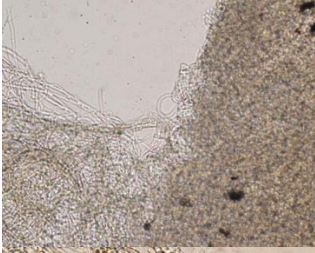

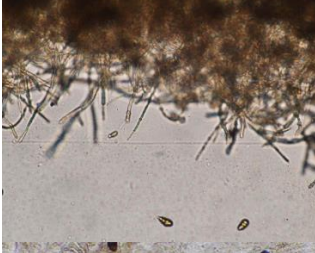
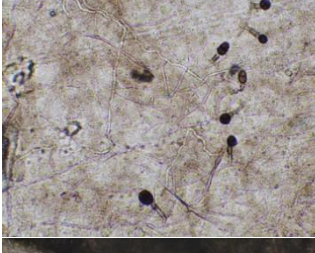
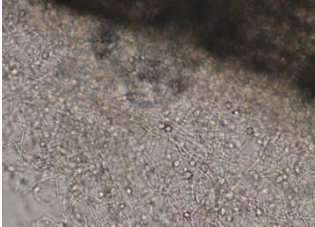
Quadro 4.1.1. Descrição morfocultural dos fungos 1, 2, 3, 4 e 5

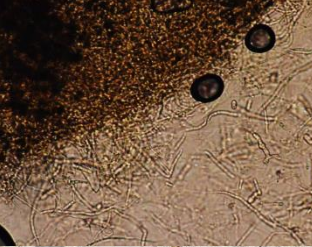
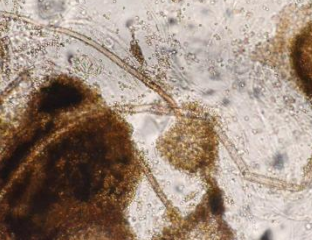
Fungo Características	1	2	3	4	5
face superior					
face inferior					
aspecto cultural	cotonoso	cotonoso	pulverulento	pulverulento	cotonoso
densidade	muito alta	alta	Média	muito alta	média
coloração da face superior	grisens	albus/grisens	rens/grisens	isabelinus/ umbrinus	albus/ fumosus
coloração da face inferior	grisens	grisens	grisens	isabelinus/ umbrinus	isabelinus/ fuliginus
frente de crescimento	regular; concêntrica	regular; concêntrica	regular circular	regular concêntrica	irregular; lóbulos
aspeto à transparência	homogêneo	homogêneo	homogêneo	homogêneo	não homogênia
zonagem	não	sim; radial	não	sim; radial/globular	sim; globular
presença de pigmentos difusíveis no meio	não	não	não	não	não

Quadro 4.1.2. Descrição morfocultural dos fungos 7, 8, 9, 10 e 11

Fungo	7	8	9	10	11
Características					
face superior					
face inferior					
aspecto cultural	cotonoso	pulverulento	pulverulento	cotonoso	pulverulento; presença de esporos amarelados no centro; formação de esclerotos circulares rosados
densidade	alta	média	média	alta	baixo
coloração da face superior	albus	aurantiacus	olivaceus	albus/ fumosus	avelaneus
coloração da face inferior	albus	aurantiacus	niger	umbrinus	avelaneus
frente de crescimento	regular; concêntrica	irregular, radial	regular circular	regular; concêntrica	regular; concêntrica
aspecto à transparência	homogêneo	homogêneo	homogêneo	homogêneo	homogêneo
zonagem	não	não	não	sim; radial	não
presença de pigmentos difusíveis no meio	não	sim alaranjado	não	não	não

Quadro 4.1.3. Observação microscópica e descrição de estruturas reprodutivas dos fungos isolados

Fungo	Descrição de estruturas microscópicas	Fotografia	Ampliação
1	sem a presença de conidióforos e conídios		10x10
2	sem a presença de conidióforos e conídios		10x10
3	conidióforos ramificados perto do ápice, penicilados terminando em fiáldes; conídios hialinos, unicelulados, a maioria globosos ou ovóides		10x40
4	conidióforos escuros e simples; conídios escuros, com septos cruzados e longitudinais; de formas variadas, obclavada a ovóide.		10x10
5	conidióforos escuros, simples com inchaço terminal mais escuro, curto a longo, com um único conídio terminal; conídios escuros, com cruz e septos longitudinais, de forma variável, frequentemente globosa a ovóide.		10x40
7	presença de clamidósporos hialinos		10x10












8	os conidióforos são eretos produzindo poucas fiálides densamente verticilados em vários níveis; conídios ovalados a irregulares, unicelulares, com coloração amarelada		10x40
9	conidióforos retos, ramificados de várias formas perto do ápice, agrupados ou isolados; conídios hialinos com uma célula, de forma e tamanho variáveis, ovóides a irregulares, em cadeias acropetais simples ou ramificadas.		10x40
10	sem a presença de conidióforos e conídios		10x10
11	conidióforos na posição vertical, simples, terminando em um inchaço globoso, contendo fiálides irradiando de toda a superfície; conídios globulares de uma célula, em massa.		10x10

Através dos três procedimentos utilizados identificaram-se todos os fungos até à espécie, principalmente devido à utilização de técnicas moleculares. No Quadro 4.1.4 apresenta-se uma compilação das espécies correspondentes aos fungos isolados neste trabalho.

Quadro 4.1.4. Identificação dos fungos isolados

Fungo	Espécie a que corresponde
1	<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.
2	<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.
3	<i>Penicillium digitatum</i> Pers.
4	<i>Alternaria alternata</i> Fr.
5	<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.
7	<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.
8	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> Link.
9	<i>Cladosporium sphaherospermum</i> Penz.
10	<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.
11	<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm.

Quadro 4.2. Provas de patogenicidade

Fungo	Controlos – Não inoculado					
Fotografia						
Resultado	Negativo					
Fungo	Fungo 1	Fungo 2	Fungo 3	Fungo 4		
	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Alternaria alternata</i>		
Fotografia						
Resultado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
Fungo	Fungo 5	Fungo 7	Fungo 8	Fungo 9	Fungo 10	Fungo 11
	<i>Stemphylium botryosum</i>	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Acrostagmus luteoalbus</i>	<i>Cladosporium spaherospermum</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Fotografia						
Resultado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

4.2. Provas de patogenicidade

Os resultados das provas de patogenicidade a que foram sujeitos os fungos isolados apresenta-se no Quadro 4.2, associados às fotografias dos frutos inoculados para sua realização.

Dos fungos isolados a partir de manchas necróticas e podridões em frutos apenas os fungos *Neofusicoccum parvum* 1, *Neofusicoccum parvum* 2, *Penicillium digitatum* 3, *Alternaria alternata* 4 e *Neofusicoccum parvum* 10 apresentaram resultados positivos nas provas de patogenicidade, causando sintomas nos frutos inoculados, como se pode ver pelo Quadro 4.2.

Apenas estes fungos são considerados fitopatogénicos em frutos e serão utilizados para os ensaios.

4.3. Provas de extratos crus de plantas e endófito e óleos essenciais

4.3.1 Provas *in vitro*

Os extratos e óleos essenciais encontram-se organizados consoante os solventes ou dispersantes utilizados no Quadro 4.3.

Quadro 4.3. Extratos crus e óleos essenciais organizados por solvente ou dispersante utilizado

Solvente / dispersante	Extratos crus e óleos essenciais
H₂O	482; 485; 486; 487; 488; 489; 491; 492; 494; 497; 500
EtOH	483; 493; 496; 498; 499; 178; 182; 209; 358; 453; 454; 508; 775; 808; 1149; 1123
DMSO	994; 995; 996; 997; 998

Os valores de percentagem de inibição médios e respetivos desvios padrão encontram-se sintetizados no Quadro 4.4.1. Para avaliar os resultados de ação fungistática dos extratos crus ensaiados, devem ser comparados com os resultados que se encontram nos Quadros 7.2.1 a 7.2.27 presentes nos Anexos. Estes Quadros encontram-se organizados por extrato, compilando para cada fungo a percentagem de inibição do extrato, o desvio padrão e os valores de Z e P das análises estatísticas do teste de Mann-Whitney, permitindo avaliar a significância estatística dos resultados obtidos.

Quadro 4.4.1. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos extratos crus testados a 1mg/mL *in vitro* para os fungos estudados

Extratos de plantas e fungo	1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	3 <i>Penicillium digitatum</i>	4 <i>Alternaria alternata</i>	10 <i>Neofusicoccum parvum</i>
482 – <i>Vaccinium cylindraceum</i>	-16,1 ±15,2	15,1 ±8,4	-6,9±10,2	1,42 ±35,6	-7,0 ±5,7
485 – <i>Lobelia urens</i>	-9,1 ±15,8	7,1 ±7,7	6,1 ±9,0	-10,7 ±15,0	5,3 ±6,1
486 – <i>Phytolacca americana</i>	-24,6 ±22,3	12,9 ±8,3	31,4 ±7,1	-24,6 ±22,3	14,3 ±10,8
487 – <i>Digitalis purpurea</i>	-8,7 ±15,0	5,1 ±13,2	-4,1 ±8,8	-8,7 ±15,0	-7,7 ±9,5
488 – <i>Agrimonia eupatoria</i>	-0,3 ±19,2	5,3 ±10,3	3,8 ±11,5	-0,3 ±19,2	1,8 ±6,4
489 – <i>Lythrum junceum</i>	-27,0 ±18,5	22,8 ±27,2	10,6 ±9,9	-27,0 ±18,5	-11,1 ±11,0
491 - <i>Ilex perado</i>	-4,4 ±18,9	15,2 ±6,0	-9,0 ±11,2	-4,4 ±18,9	-17,7 ±11,8
492 – <i>Laurus novocanariensis</i>	5,5 ±18,5	66,9 ±5,1	-4,3 ±13,3	5,5 ±18,5	1,4 ±7,6
494 – <i>Apollonias barbujana</i>	0,3 ±27,7	3,4 ±11,5	1,6 ±7,6	0,3 ±27,7	-15,1 ±7,8
497 – <i>Prunus lusitânica</i>	-21,1 ±16,2	4,9 ±7,9	4,9 ±8,2	-21,1 ±16,2	1,0 ±10,6
500 – <i>Picconia excelsa</i>	13,9 ±26,1	3,2 ±7,1	12,0 ±10,9	13,9 ±26,1	-4,9 ±15,3
483 – <i>Mentha suaveolens</i>	40,7 ±6,5	8,0 ±75,8	34,6 ±2,9	31,0 ±13,9	28,7 ±8,0
493 – <i>Ocotea foetens</i>	-9,4 ±24,9	2,8 ±17,3	-9,3 ±9,0	9,5 ±3,8	-39,1 ±16,9
496 – <i>Melia azedarach</i>	-7,6 ±16,6	0,6 ±10,1	15,5 ±10,2	13,7 ±17,0	-38,7 ±17,3
498 – <i>Myrica faya</i>	-9,8 ±21,9	3,3 ±16,3	16,5 ±11,1	11,1 ±18,3	-30,3 ±36,4
499 – <i>Persea indica</i>	-12,7 ±25,1	1,1 ±9,1	10,6 ±12,5	-0,6 ±5,9	-16,1 ±14,6
178 – <i>Argyranthemum frutescens</i>	41,4 ±5,0	25,9 ±7,8	-4,1 ±10,3	-8,2 ±7,7	20,1 ±6,7
182 – <i>Artemisia thuscula</i>	6,6 ±10,9	13,3 ±14,4	12,4 ±11,4	8,5 ±10,3	-16,5 ±5,9
209 – <i>Argyranthemum broussoneti</i>	3,9 ±8,6	0,01 ±11,5	19,4 ±10,4	4,5 ±5,6	-44,4 ±12,4
358 - <i>Argyranthemum frutescens</i>	1,5 ±9,9	0,9 ±15,4	14,1 ±7,2	-13,5 ±11,2	-43,1 ±24,1
453 – <i>Hedychium gardneranum</i>	-15,0 ±13,6	-15,2 ±8,8	33,0 ±6,0	0,6 ±7,8	-50,6 ±10,3
454 – <i>Solanum mauritianum</i>	-6,7 ±7,2	-15,0 ±5,2	17,7 ±11,1	-7,4 ±7,7	-55,0 ±14,4
508 - <i>Persea indica</i>	-3,5 ±10,2	-17,5 ±11,4	18,3 ±10,3	1,3 ±19,1	-16,8 ±13,3
775 – <i>Artemisia thuscula</i>	-5,3 ±8,1	3,0 ±14,3	23,8 ±7,5	21,3 ±7,0	-18,0 ±10,7
808 - <i>Artemisia thuscula</i>	5,2 ±15,9	4,5 ±9,7	24,7 ±7,9	18,2 ±6,6	-29,8 ±9,1
1149 – <i>Nicotiana glauca</i>	15,1 ±10,7	11,8 ±9,5	29,7 ±18,9	35,5 ±7,5	10,8 ±13,9
1123 - <i>HRO8 Fusarium acuminatum</i>	31,6 ±28,2	18,1 ±17,0	40,7 ±12,4	50,0 ±4,8	4,8 ±12,0

Os extratos que apresentaram melhores resultados foram 483, 775, 808, 1149 e 1123, correspondentes a *Mentha suaveolens*, *Artemisia thuscula*, *Nicotiana glauca* e *HRO8 Fusarium acuminatum*, respectivamente, por serem estatisticamente significativos, terem percentagens de inibição positivas e mais altas iguais ou superiores a 15 % e com resultados abrangentes por inibirem o crescimento de vários fungos diferentes. Por estas razões foram seleccionados para ensaiar nas provas *in vivo*.

Com o extrato do fungo endófito *HRO8 Fusarium acuminatum* obtiveram-se resultados positivos com *Neofusicoccum parvum* 1 e 2, *Penicillium digitatum* e *Alternaria alternata*, e percentagens de inibição bastante elevadas, 31,5 %, 18,1 %, 40,7 % e 50,0 % respetivamente, como conseguimos ver através do Quadro 7.2.27.

O extrato 483 de *Mentha suaveolens*, apresentou resultados estatisticamente significativos bastante satisfatórios. *Neofusicoccum parvum* 1 foi inibido em 40,7 %, *Penicillium digitatum* em 34,6 %, *Alternaria alternata* em 31,0 % e *Neofusicoccum parvum* 10 em 28,7 % Quadro 7.2.12.

O extrato 1149 de *Nicotiana glauca* inibiu o crescimento de *Neofusicoccum parvum* 1 em 15,1 %, *Penicillium digitatum* em 29,7 % e *Alternaria alternata* em 35,5 % Quadro 7.2.26.

Apesar de o extrato de *Artemisia thuscula* 182, extraído a partir da raiz, apenas ter apresentado valor significativos positivos de inibição de crescimento fúngico com *Penicillium digitatum* com a percentagem de 12,4 %, os extratos 775 e 808, provenientes de folhas e toda a parte aérea da planta, respetivamente, inibiram o crescimento de *Penicillium digitatum* em 23,8 % e 24,7 %, e de *Alternaria alternata* em 21,3 % e 18,2 %, respetivamente Quadros 7.2.18, 7.2.24 e 7.2.25.

Estes resultados, apesar de não serem muito elevados, reforçam a tese de que *Artemisia* spp. produz compostos com ação fungistática sobre alguns patógenos Pandey, 2017; Cosoveanu, 2013.

Ambos os extratos apresentaram valores próximos e foram obtidos a partir de partes semelhantes da mesma espécie botânica e por essas razões apenas 808 será utilizado para as provas *in vivo*. Por outro lado, o crescimento de *Neofusicoccum parvum* 10 foi estimulado com todos os extratos de *Artemisia thuscula* testados, 182, 775 e 808, com percentagens de inibição de -16,5 %, -19,0 % e -29,8 %. Estes resultados sugerem que estes extratos poderão contribuir para um estímulo do crescimento de *Neofusicoccum parvum*, no entanto serão comparados com os dos outros isolados de *N. parvum* e das provas *in vivo* no caso do extrato 808.

Extratos de *Lobelia urens*, *Digitalis purpurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Apollonias barbujana*, *Prunus lusitânica*, *Melia azedarach* e o extrato da parte aérea de *Persea indica*, correspondentes aos códigos 485, 487, 488, 494, 497, 496 e 499 respetivamente, ou não apresentaram resultados estatisticamente significantes ou apresentaram resultados significativos mas com percentagem de inibição negativa Quadros 7.2.2, 7.2.4, 7.2.5, 7.2.9, 7.2.10, 7.2.14 e 7.2.16.

Apenas o crescimento de *Penicillium digitatum* foi inibido pelos extratos de *Argyranthemum broussoneti*, *Argyranthemum frutescens*, *Hedychium gardnerianum*, *Solanum mauritianum* e pelo extrato de folhas de *Persia indica*, correspondentes aos códigos 209, 178, 453, 454 e 508 respetivamente Quadros 7.2.19, 7.2.17, 7.2.21, 7.2.22 e 7.2.23.

Os extratos 482, 486, 489, 491 e 492, respectivos a *Vaccinium cylindraceum*, *Phytolacca americana*, *Lythrum junceum*, *Ilex perado* e *Laurus novocanariensis* apenas inibiram significativamente o crescimento de um dos fungos acima de 15 % Quadros 7.2.1, 7.2.3, 7.2.6, 7.2.7 e 7.2.8.

Os extratos 500 de *Picconia excelsa*, 493 de *Ocotea foetens* e 498 de *Myrica faya*, apesar de inibirem positivamente e de forma significativa alguns fungos, os resultados foram sempre inferiores a 15 % de percentagem de inibição Quadros 7.2.11, 7.2.13 e 7.2.15.

O extrato 178 de *Argyranthemum frutescens* não será ensaiado *in vivo*, no entanto apresenta resultados interessantes com todos os isolados de *Neofusicoccum parvum* testados, com 41,4 % de inibição com *Neofusicoccum parvum* 1, 25,9 % com *Neofusicoccum parvum* 2 e 20,1 % com *Neofusicoccum parvum* 10 Quadro 7.2.17.

No Quadro 4.4.2. estão sintetizados os valores de percentagem de inibição médios e respectivos desvios padrão dos óleos essenciais testados. Os resultados encontram-se descritos por óleo essencial, associados aos valores de Z e P das análises estatísticas dos testes de Mann-Whitney, nos Quadros 7.3.1 a 7.3.5.

Quadro 4.4.2. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos óleos essenciais testados a 1mg/mL *in vitro* para os fungos estudados

Óleos essenciais	1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	3 <i>Penicillium digitatum</i>	4 <i>Alternaria alternata</i>	10 <i>Neofusicoccum parvum</i>
994 - <i>Hyptis suaveolens</i>	4,6 ±24,9	23,8 ±36,7	10,4 ±9,4	6,8 ±3,4	-2,0 ±9,1
995 - <i>Melaleuca sp.</i>	-10,9 ±8,6	18,0 ±32,5	3,6 ±4,9	18,5 ±6,5	0,5 ±10,6
996 - <i>Ocimum basilicum</i>	-7,2 ±15,9	-3,8 ±7,6	17,8 ±8,4	15,8 ±4,5	-6,8 ±9,0
997 - <i>Callistemon sp.</i>	-6,0 ±10,0	2,6 ±6,1	-1,6 ±7,0	-1,3 ±5,4	-0,8 ±3,5
998 - <i>Azadirachta indica</i>	-17,1 ±7,2	7,5 ±6,9	2,5 ±10,5	0,1 ±4,1	-0,8 ±12,7

Dos óleos essenciais testados, apenas 994, 995 e 996, provenientes de *Hyptis suaveolens*, *Melaleuca sp.* e *Ocimum bacilliscus* respetivamente, apresentaram alguns resultados positivos e estatisticamente significativos. Nos ensaios *in vitro* com os óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* e *Ocimum bacilliscus* apenas se obtiveram resultados com significância estatística com *Penicillium digitatum* e *Alternaria alternata*, com percentagens de inibição de 10,4 % e 6,8 % com *Hyptis suaveolens*, e 17,8 % e 15,8 % com *Ocimum bacilliscus*, respetivamente.

O efeito do óleo essencial de *Melaleuca sp.* foi apenas estatisticamente significativo com *Alternaria alternata* com percentagem de inibição de 18,5 %. Apesar de estes resultados não serem muito satisfatórios, por serem poucos óleos essenciais, serão utilizados nos ensaios *in vivo*, e comparados os resultados obtidos em ambas as provas Quadros 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3.

Com os óleos essenciais 997 e 998, provenientes de *Callistemon sp.* e *Azadirachta indica*, respetivamente, obtiveram-se percentagens de inibição muito baixas ou negativas e estatisticamente insignificantes Quadros 7.3.4 e 7.3.5.

No Quadro 4.4.3. estão sintetizados os valores de percentagem de inibição médios e respectivos desvios padrão dos fungicidas utilizados como referência. Os resultados encontram-se descritos por extrato, associados aos valores de H e P das análises estatísticas dos testes de Kruskal-Wallis, nos quadros 7.4.1 e 7.4.2.

Quadro 4.4.3. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos fungicidas químicos testados a 1mg/mL *in vitro* para os fungos estudados

Fungicidas	1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	3 <i>Penicillium digitatum</i>	4 <i>Alternaria alternata</i>	10 <i>Neofusicoccum parvum</i>
zirame	78,2 ±3,0	80,9 ±2,7	79,1 ±2,8	73,6 ±6,8	83,5 ±2,0
metilparabeno	70,4 ±7,9	67,2 ±12,6	56,6 ±17,9	71,2 ±5,3	-33,0 ±8,3

Ambos os fungicidas tiveram resultados com estatisticamente significantes. As percentagens de inibição foram bastante altas com ambos os fungicidas em todos os fungos, com excepção do metilparabeno com *Neofusicoccum parvum* 10. Note-se também os valores bastante pequenos de desvio padrão ao contrário do que se verificou com os extratos crus e óleos essenciais testados, o que permite evidenciar a enorme variabilidade quando trabalhamos com produtos de origem biológica.

Na Figura 4.1, apresentam-se os resultados, sob a forma de boxplot, das provas *in vitro* dos fungicidas de referência e extratos crus e óleos essenciais seleccionados por terem resultados superiores e que serão posteriormente testados *in vivo* sobre frutos. Desta forma pode-se ter maior percepção da distribuição dos dados.

Para comparar os resultados dos produtos testados com os dos fungicidas de referência deve ser interpretado em conjunto com os Quadros 7.4.1, 7.4.2, 7.2.12, 7.2.25, 7.2.26, 7.2.27, 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3, que se encontram em anexo, organizados por fungo, e onde se apresentam os valores de Z e P das provas de Mann-Whithney, para aferir se os resultados dos fungicidas de referência são significativamente distintos dos obtidos com os extratos e óleos essenciais.

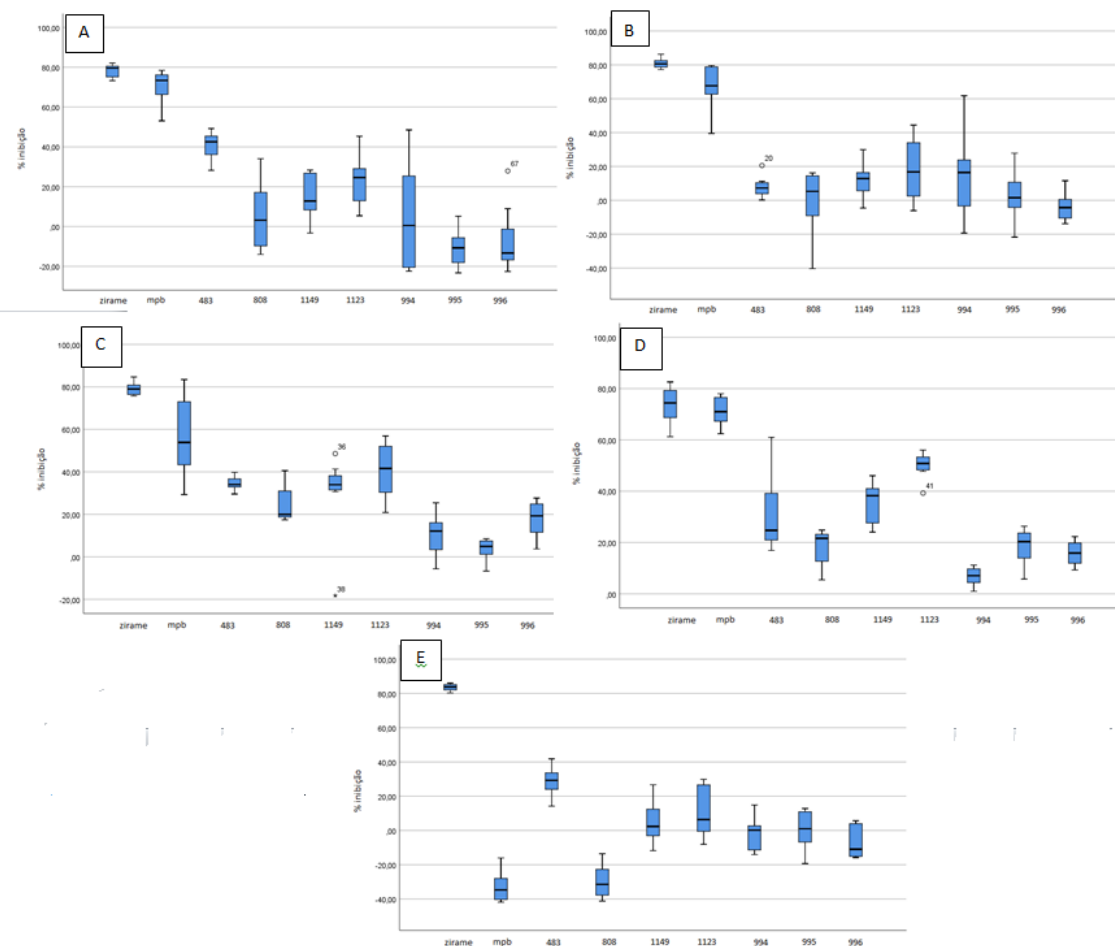


Figura 4.1. Distribuição dos dados das provas *in vitro* dos fungicidas de referência, extratos crus e óleos essenciais seleccionados, em boxplot. A. Fungo *Neofusicoccum parvum* 1; B. Fungo *Neofusicoccum parvum* 2; C. Fungo *Penicillium digitatum* 3; D. Fungo *Alternaria alternata* 4; E. Fungo *Neofusicoccum parvum* 10.

Em todos os casos, os resultados entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência foram significativamente distintos, com excepção do extrato 808 de *Artemisia thuscula* e o fungicida metilparabeno com o fungo 10 *Neofusicoccum parvum*, devido a valores de percentagem de inibição negativos de metilparabeno com este fungo. Estes resultados evidenciam que a 1mg/mL nenhum extrato ou óleo essencial inibe o crescimento dos fungos patogénicos tão bem como os fungicidas químicos provados, tirando o caso dos resultados de metilparabeno com o fungo 10. No entanto, verifica-se que o extrato 483 de *Mentha suaveolens* e 1123 de HRO8 *Fusarium acuminatum* são os que mais se aproximam dos resultados dos fungicidas de referência.

Tanto a distribuição dos dados como a análise não paramétrica através de provas de Mann-Whithney foram feitas para a concentração de 1mg/mL de todos os produtos.

De forma a poder comparar de forma mais fidedigna os resultados, foram calculados e comparados os valores de EC_{50} .

4.3.2 Valores calculados de EC₅₀

No Quadro 4.5 apresentam-se os valores de EC₅₀ que se conseguiram calcular através do ajuste das respostas de várias doses através de uma transformação probit. A distribuição dos resultados que se tentaram ajustar a uma curva de dose-resposta encontram-se em anexo nos Quadros 7.7.1 a 7.7.9, organizados por produto e fungos ensaiados.

Quadro 4.5. Valores de EC₅₀ calculados através de curvas de dose-resposta transformadas por probit

	483	1149	1123	808	994	995	996	metil parabeno	zirame
Fungo 1	1,146 1,013-1,461	nc	nc	nc	nc	nc	nc	0,426 0,182-0,597	0,139 0,106-0,189
Fungo 2	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	0,628 0,369-1,426	0,075 0,055-0,100
Fungo 3	2,284 1,380-11,789	1,252 1,088-1,597	nc	nc	nc	nc	nc	0,753 0,539-1,237	0,055 0,044-0,068
Fungo 4	1,454 1,110-12,032	nc	1,291 0,847-2,707	nc	nc	nc	nc	0,464 0,381-0,561	0,051 0,036-0,070
Fungo 10	2,584 1,674-6,849	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	0,030 0,012-0,053

nc= Não calculável

Note-se a dificuldade em calcular o valor de EC₅₀ para a maioria dos extratos e óleos essenciais. A maioria dos valores de EC₅₀ não puderam ser calculados uma vez que neste tipo de ensaios biológicos, utilizaram-se apenas 3 concentrações diferentes para tentar obter uma curva de resposta devido à pouca disponibilidade dos produtos a testar, e muitas das curvas não seguiram uma distribuição dose-resposta, pelo que os valores de EC₅₀ obtidos através da transformação probit não seriam valores razoáveis. Quando as três concentrações têm um resultado que se adapta a uma curva de dose-resposta, o cálculo de EC₅₀ pode ser bastante fiável.

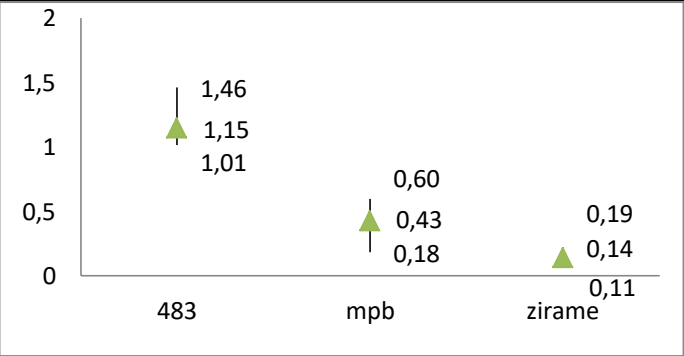
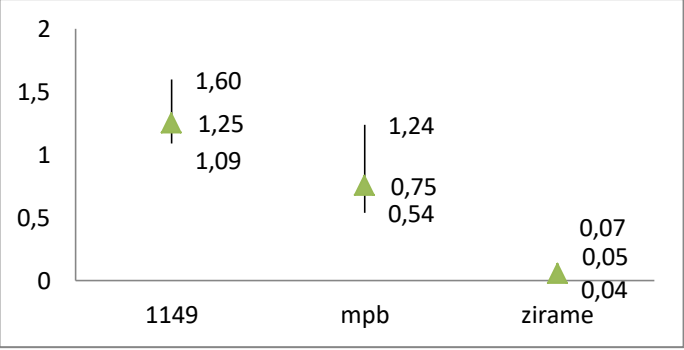
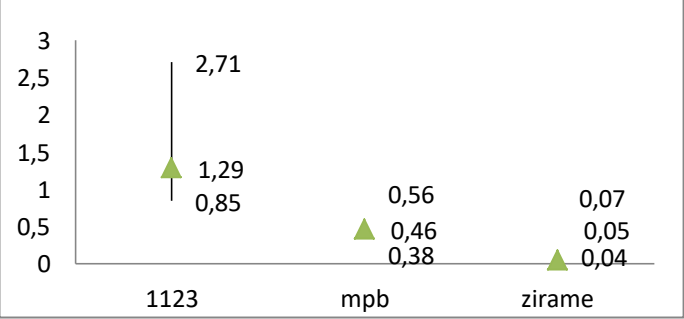
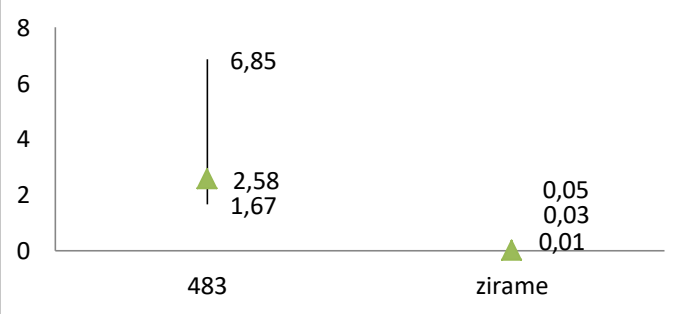
Ao trabalhar com organismos vivos, os fungos podem ter um crescimento variável, dificultando o ajustamento dos resultados a uma curva dose-resposta.

Idealmente, o ensaio deveria ser repetido com uma maior gama de concentrações de produto de forma a obter um melhor ajuste.

Mais uma vez se verifica a maior dificuldade em trabalhar com produtos de origem biológica neste tipo de ensaios. No caso dos fungicidas químicos de referência, foi muito mais fácil ajustar os dados a uma curva dose-resposta, o que permitiu calcular os valores de EC₅₀ em quase todos os casos e com uma maior precisão, com o intervalo de confiança a 95 % muito mais estreito, em especial no caso do fungicida zirame.

No Quadro 4.6 apresentam-se os valores estimados, máximos e mínimos de EC_{50} , com 95 % de confiança e o resultado do quociente entre os valores estimados de EC_{50} do extrato em prova, quando calculável, e de EC_{50} dos fungicidas de referência. Este quociente permite comparar a ação do extrato com a dos fungicidas químicos utilizados como referência, avaliando a potência do extrato como composto fungistático.

Quadro 4.6. Valores estimados, máximos e mínimos de EC₅₀, com 95 % de confiança, e comparação entre valores de EC₅₀ de extratos e fungicidas de referência

Fungo	Valores estimados, máximos e mínimos de EC ₅₀ , com 95 % de confiança	Quociente entre valores de EC ₅₀ de extratos e fungicidas de referência
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>		$EC_{50}483 / EC_{50} \text{ zirame} \approx 8$ $EC_{50}483 / EC_{50} \text{ metilparabeno} \approx 3$
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	Modelos não ajustados	Modelos não ajustados
3 <i>Penicillium digitatum</i>		$EC_{50}1149 / EC_{50} \text{ zirame} \approx 23$ $EC_{50}1149 / EC_{50} \text{ metilparabeno} \approx 2$
4 <i>Alternaria alternata</i>		$EC_{50}1123 / EC_{50} \text{ zirame} \approx 25$ $EC_{50}1123 / EC_{50} \text{ mpb} \approx 3$
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>		$EC_{50}483 / EC_{50} \text{ zirame} \approx 87$

Devido ao facto de não se ter conseguido calcular a maioria dos valores de EC_{50} associados aos produtos e aos fungos, não se podem retirar muitas conclusões da comparação dos valores de EC_{50} . No entanto, conseguiu-se verificar que para o isolado 1 de *Neofusicoccum parvum* o extrato 483 tem $\frac{1}{8}$ da potência de zirame e $\frac{1}{3}$ da de metilparabeno, para *Penicillium digitatum* o extrato 1149 tem $\frac{1}{23}$ da potência de zirame e $\frac{1}{2}$ da de metilparabeno, para *Alternaria alternata* o extrato 1123 tem $\frac{1}{25}$ da potência de zirame e $\frac{1}{3}$ da de metilparabeno e que para *Neofusicoccum parvum* 10 o extrato 483 teve uma potência de $\frac{1}{87}$ em relação a zirame. Os resultados obtidos pelos isolados diferentes de *N. parvum* com o extrato 483, evidenciam mais uma vez, grandes diferenças entre isolados de fungos pertencentes à mesma espécie.

4.3.3. Provas *in vivo*



Figura 4.2. Exemplo de provas *in vivo* com extratos vegetais

Na Figura 4.2. apresenta-se uma imagem de frutos com manchas resultantes das provas *in vivo*.

Os resultados médios e desvios padrão obtidos nas provas *in vivo* encontram-se no Quadro 4.7, no entanto estes resultados devem ser complementados com a análise não paramétrica realizada através do teste Mann-Whitney, cujos valores de Z e P se apresentam nos Quadros 7.5.1 a 7.5.7.

Quadro 4.7. Valores médios e desvio padrão de percentagem de inibição dos extratos crus e óleos essenciais a 1mg/mL testados *in vivo* para os fungos estudados

	1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	3 <i>Penicillium digitatum</i>	4 <i>Alternaria alternata</i>	10 <i>Neofusicoccum parvum</i>
483 - <i>Mentha suaveolens</i>	8,5 ±87,3	-5,1 ±89,8	31,9 ±48,0	1,9 ±69,5	50,3 ±17,9
808 - <i>Artemisia thuscula</i>	38,2 ±72,9	-0,7 ±78,6	60,8 ±14,3	33,8 ±28,8	37,4 ±31,3
1149 - <i>Nicotiana glauca</i>	5,9 ±61,9	29,3 ±71,1	16,3 ±31,3	33,9 ±51,7	71,3 ±8,5
1123 - HRO8 <i>Fusarium acuminatum</i>	10,2 ±86,9	-24,2 ±91,5	2,25 ±89,3	33,5 ±43,5	53,2 ±34,0
994 - <i>Hyptis suaveolens</i>	-51,9 ±93,3	33,1 ±44,3	45,3 ±43,6	45,0 ±21,6	55,8 ±19,5
995 - <i>Melaleuca sp.</i>	2,6 ±63,7	54,6 ±33,5	10,5 ±81,1	32,8 ±27,1	52,6 ±16,3
996 - <i>Ocimum basilicum</i>	nr	nr	60,1 ±25,2	27,3 ±43,1	60,4 ±19,8

nr = prova não realizada

Dos extratos provados *in vivo*, nenhum apresentou resultados positivos e estatisticamente significativos na limitação do crescimento de *Neofusicoccum parvum* 1. Com *Neofusicoccum parvum* 2 apenas o óleo essencial 955 de *Melaleuca sp.* apresentou resultados positivos e significativos com uma percentagem de inibição de 54,6 %. Por outro lado, os resultados com *Neofusicoccum parvum* 10 foram todos positivos com significância estatística e percentagens de inibição bastante elevadas.

O extrato *Mentha suaveolens* 483 inibiu em 31,9 % o crescimento de *Penicillium digitatum* e em 50,3 % *Neofusicoccum parvum* 10 e não teve efeito sobre os restantes fungos nas provas *in vivo* Quadro 7.4.1.

Penicillium digitatum foi inibido em 60,8 % pelo extrato de *Artemisia thuscula* 808, *Alternaria alternata* em 33,8 % e *Neofusicoccum parvum* 10 em 37,4 % Quadro 7.5.2.

Os extratos de *Nicotiana glauca* 1149 e do fungo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum* 1123, apenas apresentaram resultados satisfatórios com *Alternaria alternata*, com percentagem de inibição de 33,9 % e 33,5 % respectivamente, e *Neofusicoccum parvum* 10, com 71,3 % e 53,2 % de percentagem de inibição respectivamente Quadros 7.5.3 e 7.5.4.

O óleo essencial de *Hyptis suaveolens* 994, apesar de ter apresentado percentagens de inibição elevadas com *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* e *Neofusicoccum parvum* 10, 45,3 %, 45,0 % e 55,8 % respectivamente, provocou um estímulo no crescimento de *Neofusicoccum parvum* 1, correspondente a um valor de percentagem de inibição de -51,9 % Quadro 7.5.5.

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* 996 inibiu em 60,1 % do crescimento de *Penicillium digitatum*, 27,3 % de *Alternaria alternata* e 60,4 % de *Neofusicoccum*

parvum 10, valores bastante elevados. Os isolado 1 e 2 de *Neofusicoccum parvum* não foram submetidos a provas *in vivo* com este extrato por razões logísticas Quadro 7.5.7.

Os melhores resultados, tendo em conta as percentagens de inibição e a maior abrangência de fungos cujo crescimento foi afectado pelo produto, foram obtidos com o óleo essencial de *Melaleuca* sp. 995, com percentagens de inibição de 54,6 % com *Neofusicoccum parvum* 2, 10,5 % com *Penicillium digitatum*, 32,8 % com *Alternaria alternata* e 52,6 % com *Neofusicoccum parvum* 10 Quadro 7.5.6.

De modo geral todos os produtos testados tiveram grandes percentagens de inibição com *Alternaria alternata*, *Neofusicoccum parvum* 10 e *Penicillium digitatum*, com significância estatística. *Neofusicoccum parvum* 1 e 2 não apresentaram diferença de crescimento significativa do grupo de controlo com a maioria dos extratos crus e óleos vegetais provados *in vivo*.

Note-se que se obtiveram valores de percentagem de inibição muito superiores e mais abrangentes *in vivo* do que *in vitro* no caso dos óleos essenciais testados 994, 995 e 996, o que não seria de esperar.

Os óleos essenciais 994 e 995, apenas tiveram ação inibitória significativa sobre *Penicillium digitatum* e *Alternaria alternata* *in vitro*, no entanto, nas provas *in vivo*, também inibiram o crescimento de *N. parvum* 10.

O óleo essencial 996, nas provas *in vitro* apenas teve ação positiva sobre *Alternaria alternata*, no entanto, nos ensaios *in vivo* com frutos, originou bons resultados com todos os fungos, com exceção de *N. parvum* 1.

O extrato de *Mentha suaveolens* 483, que apresentou resultados positivos, abrangentes e com grandes valores de percentagem de inibição nas provas *in vitro*, uma vez testado *in vivo*, apenas teve ação sobre dois dos fungos, *Penicillium digitatum* e *N. parvum* 10. *Alternaria alternata* e as estirpes 1 e 2 de *Neofusicoccum parvum* não foram inibidos significativamente por este extrato.

O extrato de *Artemisia thuscula* 808, apresentou resultados congruentes *in vivo* quando comparado com as provas *in vitro*, com exceção do fungo *Neofusicoccum parvum* 10 que tinha apresentado uma percentagem de inibição de crescimento negativa *in vitro*, e resultados positivos *in vivo*.

Tanto o extrato de *Nicotiana glauca* 1149 como o extrato do fungo HRO8 *Fusarium acuminatum* 1123 obtiveram valores significativos de inibição de crescimento fúngico com *Alternaria alternata* e *Neofusicoccum parvum* 10. Nas modalidades *in vitro*, o extrato 1149 tinha inibido o crescimento de *Neofusicoccum parvum* 1 e *Penicillium digitatum*, e o extrato 1123 os fungos *Neofusicoccum parvum* 1 e 2 e *Penicillium digitatum*, o que não se verificou *in vivo*. Ao contrário dos resultados do ensaios em frutos, nenhum destes extratos tinha inibido significativamente o crescimento de *Neofusicoccum parvum* 10 *in vitro*.

Nas provas *in vivo* os resultados foram muito variáveis com valores de desvio padrão muito grandes, o que justificaria a realização de mais provas com uma maior amostragem de frutos inoculados com os patógenos de forma a conseguir resultados mais fiáveis e com uma melhor precisão.

Por outro lado, nos ensaios realizados foram utilizadas mangas de diferentes variedades devido à reduzida disponibilidade de frutos para os ensaios. Ao repetir os

ensaios *in vivo* dever-se-á tentar utilizar apenas uma variedade e apresentar resultados associados com a variedade em questão, uma vez que pode ter influência no desenvolvimento dos fungos.

4.3.4 Comparação entre isolados de *Neofusicoccum parvum*

Uma vez verificados valores bastante diferentes entre os três isolados de *Neofusicoccum parvum*, procedeu-se a uma análise não paramétrica de Kruskal-Wallis para avaliar se existia diferenças significativas entre os três isolados e tentar perceber a que se poderia dever a disparidade entre os resultados. Nos Quadros 4.8.1 e 4.8.2 apresentam-se os resultados da análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis entre os resultados dos três isolados de *N. parvum* nas provas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

Quadro 4.8.1. Valores de H e de probabilidades para o teste de Kruskal-Wallis entre os resultados das provas *in vitro* dos três isolados de *Neofusicoccum parvum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato/ óleo essencial			Extrato/ óleo essencial		
482	H	13,385	178	H	14,621
	P	0,001		P	0,001
485	H	5,660	182	H	12,635
	P	0,059		P	0,002
486	H	15,380	209	H	14,985
	P	0,000		P	0,001
487	H	9,065	358	H	12,335
	P	0,011		P	0,002
488	H	15,252	453	H	14,945
	P	0,000		P	0,001
489	H	18,620	454	H	17,360
	P	0,000		P	0,000
491	H	13,841	508	H	4,860
	P	0,001		P	0,088
492	H	20,480	775	H	8,645
	P	0,000		P	0,013
494	H	4,740	808	H	14,885
	P	0,093		P	0,001
497	H	15,540	1149	H	3,755
	P	0,000		P	0,153
500	H	13,740	1123	H	2,766
	P	0,001		P	0,251
483	H	17,295	994	H	1,746
	P	0,000		P	0,418
493	H	10,805	995	H	5,435
	P	0,005		P	0,066
496	H	12,260	996	H	1,936
	P	0,002		P	0,380
498	H	3,095	997	H	3,785
	P	0,213		P	0,151
499	H	3,875	998	H	16,380
	P	0,144		P	0,000

Quadro 4.8.2. Valores de H e de probalidades para o teste de Kruskal-Wallis entre os resultados das provas *in vivo* dos três isolados de *Neofusicoccum parvum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato/ óleo essencial		
483	H	2,939
	P	0,230
808	H	5,427
	P	0,066
1149	H	17,039
	P	0,000
1123	H	14,287
	P	0,001
994	H	22,297
	P	0,000
995	H	15,073
	P	0,001

Tanto nas análises não paramétricas para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, se verificou com 95 % de confiança que a maioria dos resultados obtidos foram distintos entre os três isolados de *N. parvum*.

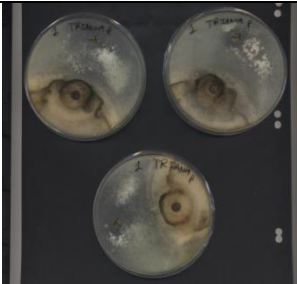
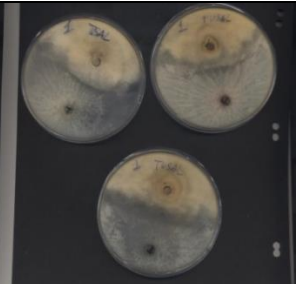
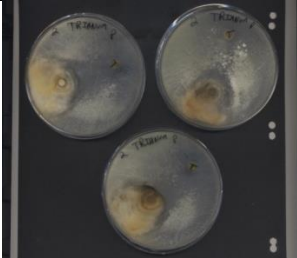




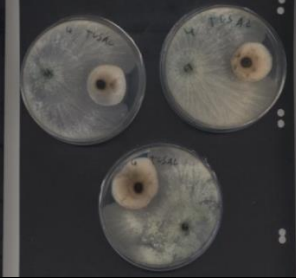


Posto isto, pode-se suspeitar que estas diferenças possam estar relacionadas com a variabilidade intraespecífica. No entanto, tal não pode ser afirmado sem que se realizem mais ensaios com mais repetições para que se possam comparar os vários isolados e retirar conclusões mais significativas.

Mais uma vez, se torna importante realçar a complexidade dos ensaios biológicos e a exigência de que exista uma grande amostragem e várias repetições dos mesmos ensaios.

4.4. Ensaios de cultivo dual com *Trichoderma* spp. *in vitro*

No Quadro 4.9, apresentam-se os resultados dos ensaios de cultivo dual entre os fungos fitopatogénicos testados e as estirpes de *Trichoderma* sp. presentes nos produtos comerciais TRIANUM – P[®] e TUSAL[®], associados às imagens das caixas de Petri dos respetivos ensaios.

Quadro 4.9. Resultados dos ensaios de cultivo dual entre as estirpes de *Trichoderma* sp. presentes nos produtos comerciais TRIANUM – P® e TUSAL® e os fungos em estudo

	TRIANUM – P®	TUSAL®
Fungo 1 – <i>Neofusicoccum parvum</i>		
Resultados Fungo 1	1	2
Fungo 2 – <i>Neofusicoccum parvum</i>		
Resultados Fungo 2	2	3
Fungo 3 – <i>Penicillium digitatum</i>		
Resultados Fungo 3	2	0
Fungo 4 – <i>Alternaria alternata</i>		
Resultados Fungo 4	1	0
Fungo 10 – <i>Neofusicoccum parvum</i>		
Resultados Fungo 10	0	2

Em todos os casos existiu um maior crescimento de *Trichoderma* spp. em relação aos fungos patogénicos, que foi dominante na competição pelo meio de cultura.

Com TRIANUM – P[®], a estirpe de *Trichoderma harzianum* T-22 entrou em contacto com o patógeno *Neofusicoccum parvum* 10 sem exercer uma zona de barreira com adensamento do micélio. Nas provas de cultivo dual com *Neofusicoccum parvum* 1 e *Alternaria alternata* as colónias dos dois fungos entraram em contacto com a formação de uma zona de barreira com adensamento do micélio do patogénico na zona de contacto. No cultivo dual em caixa de Petri de *Neofusicoccum parvum* 2 e *Penicillium digitatum* com *Trichoderma harzianum* T-22 houve inibição do crescimento micelial, com a formação de uma zona de 1 a 2 milímetros entre os fungos, que se poderá dever à produção e dispersão de compostos secundários no meios que inibem o crescimento de fungos.

O produto TUSAL[®], cuja formulação inclui inóculo de *Trichoderma atroviride* T11 e *Trichoderma asperellum* T 25, quando testado contra *Alternaria alternata* e *Penicillium digitatum*, verificou-se que as colónias cresceram até entrarem em contacto sem a formação de uma zona de barreira. Com todos os isolados de *Neofusicoccum parvum* houve a formação de uma zona de inibição de crescimento micelial entre as colónias devido à possível formação e dispersão de substâncias no meio, produzidas por um dos fungos. Com *Neofusicoccum parvum* 1 e 10 a zona de inibição apresentou 1 a 2 milímetros de espessura e *Neofusicoccum parvum* 2 mais de 2 milímetros de espessura. O melhor resultado foi obtido com TUSAL frente aos isolados de *Neofusicoccum parvum*.

Os resultados obtidos com *Neofusicoccum parvum* podem ser importantes para consolidar o estudo da interação entre espécies de *Trichoderma* sp. e fungos da família *Botriosphaeriaceae*, uma vez que para além de afetarem frutos, este fungo e outros da mesma família também estão associados a doenças de lenho, com sintomatologia de dieback Slippers e Wingfield, 2007, e a utilização de fungos antagonistas, especialmente os que possam ter comportamento endofítico, pode ser uma alternativa bastante viável para auxiliar no controlo deste tipo de doenças em mangueira e mesmo noutras culturas (Pintos, 2012).

5. CONCLUSÕES

Os fungos isolados e que apresentaram comportamento patogénico em frutos foram *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum* e vários isolados de *Neofusicoccum parvum*.

Os resultados obtidos foram muito variáveis entre os vários fungos e inclusive entre vários isolados diferentes da mesma espécie. Assim, não se pode generalizar e afirmar que os produtos podem controlar organismos causadores de estragos em pós-colheita sem que sejam testados com mais espécies e dentro da mesma espécie, isolados a partir de frutos afectados.

Dos extratos crus testados, os que apresentaram maior ação fungistática contra os patogénios testados *in vitro* foram o extrato 483 de *Mentha suaveolens* e o extrato 1123 proveniente do fungo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*, pois tiveram superiores percentagens de inibição, com significância estatística e foram os que mais se aproximaram aos resultados dos fungicidas de referência.

Os resultados obtidos com o extrato de *Mentha suaveolens* vêm a fortalecer a importância de plantas da família Lamiaceae, cujos compostos secundários têm um potencial considerável para serem estudados como fungistáticos. (Dellavalle *et al.*, 2011; Namsi *et al.*, 2018)

Outros extratos com resultados interessantes *in vitro* foram o extrato 808 de *Artemisia thuscula* e 1149 de *Nicotiana glauca*. Dos óleos essenciais testados apenas 994 de *Hyptis suaveolens*, 995 de *Melaleuca sp.* e 996 de *Ocimum bacilliscus* apresentaram alguns resultados positivos *in vitro*.

Quando ensaiados *in vivo*, apesar de a maioria dos extratos crus terem provocado elevadas percentagens de inibição, afetaram um menor número de fungos, o que seria de esperar. No entanto, os valores de desvio padrão foram muito grandes e por isso deve ser aumentada a amostragem e repetir estes ensaios.

Estudou-se o comportamento de fungos importantes em pós-colheita como *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum* e *Neofusicoccum parvum*. Em estudos futuros seria interessante estudar o comportamento de *Colletotrichum gloeosporioides*, pela sua importância a nível mundial, bem como outras espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae, como *Lasiodiplodia theobromae*, *Dothiorella sp.* *Diplodia sp.*, que causam graves prejuízos pós colheita e têm uma importância crescente, como doenças com sintomatologia de “dieback” em mangueira, e afetam outras culturas com importância económica. No entanto, os resultados obtidos com *Neofusicoccum parvum*, podem ser um ponto de partida para aprofundar mais o efeito de produtos deste tipo sobre fungos pertencentes a esta família.

Na segunda parte deste trabalho estudou-se a possibilidade de utilizar fungos antagonistas de forma a combater os fungos fitopatogénicos. Os resultados mais interessantes nas provas de cultivo dual foram obtidos com o produto comercial TUSAL®, com as estirpes *Trichoderma atroviride* T11 e *Trichoderma asperellum* T 25 contra *Neofusicoccum parvum*. No futuro, seria interessante estudar um maior leque de estirpes de *Trichoderma spp.*, bem como outros fungos antagonistas e a sua acção sobre um maior número de patogénios, não apenas associados a doenças de pós-colheita.

Por outro lado, nos casos em que as provas de cultivo dual apresentam uma zona onde não existe crescimento micelial, seria interessante estudar os compostos produzidos pelos fungos responsáveis pelo fenómeno de antibiose e avaliar a possibilidade de cultivar o fungo que produz o composto, extrair e utilizá-lo como extrato, caso do produto 1123 proveniente do fungo endófito *Artemisia austriaca* HRO8 *Fusarium acuminatum*, utilizado nos testes de ação fungistática da primeira parte deste trabalho.

Os produtos testados neste trabalho, extratos crus de plantas e fungo endófito, óleos essenciais de plantas e fungos antagonistas, não poderão ser ainda considerados como uma alternativa à utilização de meios físicos e químicos de controlo de fungos patogénicos de manga em condições de pós-colheita. No entanto, existe potencial para continuar a investigar, repetir alguns ensaios, estudar mais produtos deste tipo sobre maior número de patogénios, de forma a seleccionar os que possam vir a constituir uma alternativa ou um produto complementar no controlo de fungos causadores de estragos em manga em condições de pós-colheita, ou mesmo no controlo de algumas doenças em campo.

Este trabalho pioneiro com manga nas ilhas Canárias pode ser um importante contributo para o estudo do potencial de utilização dos extratos crus vegetais e fúngicos, óleos essenciais e fungos antagonistas como produtos e agentes de protecção de plantas, complementares ou mesmo como substitutos dos meios de luta actualmente utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN, 2005.** *Plant Pathology*. 5ª Ed. Burlington, EUA: Elsevier Academic Press.
- Alemu K, 2014.** Dynamics and Management of Major Postharvest Fungal Diseases of Mango Fruits. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **4**: 13-21
- Alemu K, Ayalew A, Woldetsadek K. 2014.** Antifungal Activity of Plant Extracts and their Applicability in Extending the Shelf Life of Mango Fruits. *Food Science and Quality Management* **33**: 47-53
- Alkan N, Kumar A. 2018.** Post-harvest storage management of mango fruit. In: Saúco VG, Lu P, eds. *Achieving sustainable cultivation of mangoes*. Cambrige, UK: Burleigh Dodds Science Publishing, **1**: 1-26
- Amaro P, 2003.** *A Protecção Integrada*. Lisboa, Portugal: ISA/Press
- Andersen PP, Cheng F, eds. 2009.** *Case Studies in Food Policy for Developing Countries Volume 1: Policies for Health, Nutrition, Food Consumption, and Poverty*. Ithaca, Nova Iorque: Cornell University Press
- Azwanida NN. 2015.** A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicine and Aromatic Plants* **4**: 1-6
- Banik AK, Kaiser SA, Dhua RS. 1996.** Evaluation of mango fruits in storage for resistance against anthracnose *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and *Diplodia* stem end rot *Diplodia natalensis* Pole Evans. *Journal of Tropical Agriculture* **34**: 121-124
- Baños SB eds. 2014.** *Postharvest Decay Control Strategies*. Morelos, Mexico: Elsevier Inc.
- Bhattacharjee AK, Pandey BK, Prakash O. 2009.** Persistence and dissipation of carbendazim residues in mango fruits after pre- And post-harvest applications. *Journal of Food Science and Technology* **46**: 347-349
- Bhuvaneswari V, Rao MS. 2001.** Evaluation of *Trichoderma viride* antagonistic to post-harvest pathogens on mango. *Indian Phytopathology* **54**: 493-494
- Bopiweb. 2019.** Hongos endófitos HTF58 *Alternaria alternata* y HRO8 *Fusarium acuminatum* de *Artemisia thuscula* y *Artemisia australis* como antifúngicos de uso agrícola. [WWW document] URL <https://bopiweb.com/hongos-endofitos-htf58-alternaria/2974123/> [accessed 15 July 2019].
- Borges RCF, Marques E, Macedo MA, Marins I, Filho JGS, Mello SCM. 2018.** Biocontrol of teak canker caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista Árvore* **42**: e420304
- Calatrava-Requena J. 2014.** Mango: Economics and International Trade. In: *Mango International Encyclopedia*. Sultanate Of Oman: Royal Court Affairs Ed.
- Cañedo V, Ames T. 2004.** *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. 1ª Ed. Lima, Peru: Centro Internacional de la Papa
- Copping LG, 1998.** *The Biopesticide Manual*. 1ª Ed. Londres, Reino Unido. British Crop Protection Council

- Cosoveanu A, Cabrera R, Mariño CG, Iacomí B. 2013.** Antifungal activity of plant extracts against pre and postharvest pathogens. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, **56**: 2285-5785
- Davenport TL. 2007.** Reproductive physiology of mango. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**:363-376.
- Dellavalle PD, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Rizza MD. 2011.** Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria*
- Deshmukh SK, Gupta MK, Prakash V, Saxena S. 2018.** Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. *Journal of Fungi* **4**: 130-171
- Diedhiou PM, Mbaye N, Faye R, Samb PI. 2014.** Field Tests of Fungicides Against Post Harvest Rot of Mangoes in Senegal. *International Journal of Science, Environment and Technology* **3**: 597-606
- Dinh Q. 2002.** Postharvest loss of mango due to anthracnose and its infection biology and resistance of mango to the disease. MSc thesis, Kasetsart University, Tailândia
- European Commission. 2020.** EU Pesticides database. [WWW document] URL <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/> [accessed 15 January 2020]
- FAO. 2017.** Faostat – Statistics Database. [WWW document] URL <http://www.fao.org/faostat/> [accessed 15 June 2019].
- FRAC. 2019.** FRAC Code List Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. [WWW document] URL <https://www.frac.info/> [accessed 14 October 2019].
- Gajera H, Domadiya R, Patel S, Kapopara M, Golakiya B. 2013.** Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agentes against phytopathogen system – a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* **1**: 133-142
- Galli JA, Fischer IH, Palharini MC. 2012.** Doenças pré e pós-colheita em variedades de manga cultivadas em sistema orgânico. *Revista Brasileira de Fruticultura* **34**: 734-743
- Galli JA, Silveira LC, Michelotto MD, Martins AL. 2008.** Powdery mildew *Oidium mangiferae* Bert. in mango varieties. *Bioscience Journal* **24**: 43-46
- Galsurker O, Diskin S, Maurer D, Feygenberg O, Alkan N. 2018.** Fruit Stem-End Rot. *Horticulturae* **4**: 1-16
- Gambari UOB, 2016.** Control of Fungal Leaf Spot disease of mango *Mangifera indica*. I with extracts of *Azadirachta indica* neem and *Zingiber officinale* Ginger. *Journal of Agricultural Research and Development* **6**: 50-55
- Harman GE, 2005.** Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190-194
- Heffer V, Powelson ML, Johnson KB, Shishkoff N. 2006.** Identification of Powdery Mildew Fungi anno 2016. [WWW document] URL <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/labexercises/Pages/PowderyMildew.aspx> [accessed 15 April 2019].

- Hernandez YC. 2014.** *Hongos Endófitos de Diferentes Variedades de Vid Vitis vinífera L.*, TFG, Universidade de La Laguna, San Cristóbal de la Laguna, Espanha
- ISTAC. 2018.** *Gobierno de Canarias – Instituto Canario de Estadística.* [WWW document] URL http://www.gobiernodecanarias.org/istac/temas_estadisticos/ [accessed 6 December 2019].
- Jacobson M. 1989.** Botanical Pesticides, Past, Present, and Future. In: Arnason JT, Philogene BJR, Moran P, eds. *Insecticides of Plant Origin*. Washington D.C., EUA: American Chemical Society, 11-24
- Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP. 2016.** A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1-14
- Krohn K, Schulz B. 2013.** Antifungal Metabolites of Endophytic Fungi. In: Razzaghi-Abyaneh M., Rai M. eds. *Antifungal Metabolites from Plants*. Berlim, Alemanha: Springer, 243-261.
- Lo'ay AA. 2005.** *Chilling injury in mangões*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, Países Baixos.
- Lopez JP. 1998.** *Productos bioactivos de plantas endémicas canarias: actividad sobre hongos fitopatógenos*. TFG, Universidade de La Laguna, San Cristóbal de la Laguna, Espanha
- Marei GI, Abdelgaleil AM. 2018.** Antifungal Potential and Biochemical Effects of Monoterpenes and Phenylpropenes on Plant Pathogenic Fungi. *Plant Protection Science* **54**: 9-16
- Mariño CG. 2006.** *Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas*, tese de Doutoramento, Universidade de La Laguna, San Cristóbal de la Laguna, Espanha
- Marques E, Martins I, Mello SC. 2017.** Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica* **18**: 1-5
- Martín JJH, González JC. 2014.** *La fruticultura del siglo XXI en España*. Espanha. Cajamar Caja Rural.
- Martínez JA. 2012.** Natural Fungicides Obtained from Plants. In: Dhanasekaran,D. ed. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. India : ISBN, 3-28
- Medina JC, Garcia HS. 2002.** *Mango: Post-harvest Operations*. Veracruz, Mexico: AGSI/FAO
- Mohsan M, Hassan MI, Ali L. 2011.** Chemotherapeutic management of *Alternaria* black spot *Alternaria alternata* in mango fruits. *Journal of Agricultural Research* **49**: 499-506
- Naeem A, 2018.** Essential Oils: Brief Background and Uses. *Remedy Publications* **1**: 1-6
- Namsi A, Maachia SB, Chaieb I, Jemni M, Berri I. 2018.** In vitro antifungal activity of medicinal plant against *Neofusicoccum mangiferae*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology* **51**: 3148-3153

- Nelson SC. 2008.** Mango anthracnose *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant disease* **48**: 1-9
- Ni HF, Yang HR, Chen RS, Liou RF, Hung TH. 2012.** New Botryosphaeriaceae fruit rot in mango in Taiwan: identification and pathogenicity. *Botanical studies* **53**: 467-478
- Orlandelli RC, Alberto RN, Rubin Filho CJ, Pamphile JA. 2012.** Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research* **11**: 1575-1585
- Pandey AK, Singh P. 2017.** The Genus *Artemisia*: A 2012-2017 Literature Review on Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal and Antioxidant Activities of Essential Oils. *Medicines* **4**: 68-93
- Paulsen HM. 2005.** Sulfur in organic farming. *Landbauforschung Vöelkenrode Sonderheft* **283**: 105-110
- Pintos C, Redondo V, Aguin O, Chaves M, Rial C, Mansilla JP. 2012.** Evaluation of *Trichoderma atroviride* as biocontrol agente against five *Botryosphaeriaceae* grapevine trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* **51**: 450
- Plane M, Joyce DC, Ogle HJ, Johnson GI. 2002.** Mango stem-end rot *Botryosphaeria dothidea* disease control by partial-pressure infiltration of fungicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **42**: 625-629
- Prakash O, Misra AK, Shukla PK. 2011.** Post harvest diseases of mango. In: *Global Conference on Augmentating Production and Utilization of Mango : Biotic and Abiotic Stresses*, 2011. Lucknow, India: ISHS Acta horticulturae, 137-144
- Rey JY, Diallo TM, Vannière H, Didier C, Kéita S, Sangaré M. 2004.** The mango in French-speaking West Africa: varieties and varietal composition of the orchards. *Fruits* **59**: 57-73
- Saave N. 2011.** *Export Factsheet ECOWAS: Mangoes*. Nigeria: International Trade Center
- Saccardo PA. 1894.** *Seu Nomenclator colorum*. Editio Altera.
- Sangeetha G, Usharani S, Muthukumar A. 2009.** Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of banana. *Phytopathologia Mediterranea* **48**: 214-225
- Santos LO, 2008.** *Conservação Pós-Colheita de Mangas Produzidas na região de Jaboticabal-SP*, tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil
- Sáuco VG. 1999.** *El cultivo del Mango*. 1ª Ed. Madrid, Espanha. Ediciones Mundi-Prensa.
- Sáuco VG. 2015.** Worldwide mango production and market: Current situation and future prospects. In: *Global Conference on Augmenting Production and Utilization Of Mango: Biotic and Abiotic Stresses*, 2011. Lucknow, India: ISHS Acta horticulturae, 69-84
- Shivakumar KV, Palaiah P, Mallesh SB, Sunkad G, Pampanna Y. 2018.** Efficacy of Fungicides and Bioagents against *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose of Mango *Mangifera indica* L.. *Environment and Ecology* **36**: 221-225

- Silva PA, Oliveira DF, Prado NRT, Carvalho DG, Carvalho GA. 2008.** Evaluation of the antifungal activity by plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Ciência e Agrotecnologia* **32**: 420-428
- Slippers B, Wingfield MJ. 2007.** Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**: 90-106
- Statista. 2017.** *Mango production worldwide from 2000 to 2017*. [WWW document] URL <https://www.statista.com/statistics/577951/world-mango-production/> [accessed 20 March 2018].
- Stone JK, Polishook JD, White JF. 2012.** Endophytic Fungi. In: Foster M, Bills G, eds. *Biodiversity of Fungi*. Estados Unidos da América: Elsevier Academic Press, 241-270
- Sudha S, Narendrappa T. 2015.** *In vitro* Efficacy of Bioagents Against *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Antracnose of Mango. *Mysore Journal of Agricultural Sciences* **49**: 355-358
- Teicher H, 2018.** *Biopesticide Regulation: A Comparison of EU and U.S. Approval Processes*. [WWW document] URL <https://www.agribusinessglobal.com/biopesticides/biopesticide-regulation-a-comparison-of-eu-and-u-s-approval-processes/> [accessed 22 July 2020]
- Thomas C, 2002.** Managing Plant Diseases with Biofungicides. *Vegetable and Small Fruit Gazette*
- Trujillo EM, Andreea C, Hernández YC, Pérez GH. 2017.** Plantas de cultivo: hongos endófitos vs hongos fitopatógenos. *Agricultura Tropical* **4**: 22-28
- Trujillo EM, Cosoveanu A, Hernández YC, Pérez GH, Giménez C, Cabrera R. 2018.** Plantas de cultivo: hongos endófitos vs hongos fitopatógenos. *Agricultura Tropical* **4**: 22-28
- Vanniere H, Rey JF, Vayssieres JF, Maraite, H. 2013.** *Crop Production Protocol Mango* Mangifera indica. Bruxelas, Bélgica. COLEACP
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* **37**: 1-20
- Villa AA. 2004.** *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas*. MSc thesis, Universidad Nacional, Colombia
- Yadav D, Singh SP. 2017.** Mango: History origin and distribution. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **6**: 1257-262
- Yahia EM, Jones RW, Thomas DB. 2011.** Quarantine pests of tropical and subtropical fruits and their control. In: Yahia EM, eds. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. UK: Woodhead publishing limited, 224-275

Quadro 7.1. Sequência de DNA das regiões ITS1 e ITS4 dos fungos isolados e espécie definitiva a que pertencem

Fungo	1	2
genbank sequence ITS1	«GTTCCAAGRGGGRTTCGRGCTCGGGCTCGACTC TCCCACCCAATGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCG GGCCGGGTGTTCCGACCGGGCGCCCTTCGGGGGG CTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATAAACCTCAG TCAGTGAACCTTCGCAGCTAAAAAACAGTTAATAAC TAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGACGCAATGCGATTAAGTAATGTGAAT TGCAGAAATTCAGTGCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGGCCCCCTGGTATTCGAGGGGCATGCCCTGTTG AGCGTCAITTC AACCCCTCAAGCTCTGCTGGTATTGG GCCCGTCCCTCCAGCGACGGCCCTAAAGACCTCGG CGGTGGCGTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCT CGCTTTGGAGCGCACGGCGTCGCCCGCCGACGCAAC CTTTGAATTAATTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTA GGGATACCCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGA GGAA»	«GTTCCAAGRGGGRTTCGRGCTCGGGCTCGACTCT CCCACCCAATGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGG GCCCGGTGTTCCGACCGGGCGCCCTTCGGGGGGCT GGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATAAACCTCCAGTCA GTGAACCTTCGCAGCTAAAAAACAGTTAATAACTAA AAGTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG AAGAACGACGCAATGCGATTAAGTAATGTGAATTGC AGAATTCAGTGCATCGAATCTTTGAACGCACATTG CGCCCTTGGTATTCGAGGGGCATGCCCTGTTGAGC GTCAITTC AACCCCTCAAGCTCTGCTGGTATTGGGCC CGTCTCCAGCGACGGCCCTTAAGACCTCGGCGGT GGCGTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCTCGCT TTGGAGCGCACGGCGTCGCCCGCCGACGCAACCTTT GAATTAATTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA»
genbank sequence ITS4	«CGGRAGGGGGKMARCCCTTGGARGAAATAATTCAAA GGTKCGTCCGGGGGGGACGCCGTGCGCTCCAAAGC GAGGTGTTTTCTACTACGCTTGGAGGCAAGACGCCACC KCCGAGGCTTTTAAAGCGCGCTCCGTGGAGGACGGGG CCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGC TCGAACAGGCATGCCCCCTCGGAATACCAAGGGCGC AATGTGCGTTCAAGATTTCGATTAATCACTGAATTCG CAATTACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCA TCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT AGTTATTAACTGTTTTTCAGACTGCGAAGTTCACCTG ACTGGAGTTTTATGTCCTCTGGGGGGCGCTGGCCA GCCCGCCGAAGGGCGCGCGGTGCGGAGGACCGCGGC CCGCCAAAGCAACAGAGGTAGGTACACATTGGGTGG GAGAGTCGAGCCGGAGCTCGAATCAACTCGGTAATGA TCCCTCCGACAGGTTACCTACGGGAAG»	«CGGRAGGGGGKMARCCCTTGGARGAAATAATTCAAA GGTKCGTCCGGGGGGGACGCCGTGCGCTCCAAAGC GAGGTGTTTTCTACTACGCTTGGAGGCAAGACGCCACC KCCGAGGCTTTTAAAGCGCGCTCCGTGGAGGACGGGG CCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGC TCGAACAGGCATGCCCCCTCGGAATACCAAGGGCGC AATGTGCGTTCAAGATTTCGATTAATCACTGAATTCG CAATTACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCA CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTA GTTATTAACTGTTTTTCAGACTGCGAAGTTCACCTGAC TGAGATTTTATGTCCTCTGGGGGGCGCTGGCCAGCC CCCCGAAGGGCGCGCGGTGCGGAGGACCGCGCGCCG CCAAAGCAACAGAGGTAGGTACACATTGGGTGGGAGA GTCGAGCCGGAGCTCGAATCAACTCGGTAATGATCCT TCCGACAGGTTACCTACGGGAAG»
Espécie definitiva	<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.	<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.

7. Anexos

7.1. Análise molecular de DNA

3	<p>«ATTITKTACCCKTGKTGCTTCGGCGGGCCCCGCC TTTACTGGCCGSGGGGGGGGCTCAGCGTCCC CCCCGCCGCCGGAAGACACCCCCGAACCTGT TGAAGATTGCAGTCTGAGTGAAGAAATTTATTA AACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATC GATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATG AATTGCAAAATTCAGTGAATCATCAGTCTTTGAACG CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGC CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCGCG TTGTGTGTGGGCCCCGTCGCCCGATCCCCGGGG ACGGCCCCGAAAAGGACGCGGCGGACCGCGTCC GGGCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCGCTC CGTAGGCCCCGGCGGCGCTGCCGATCAACCCCA AATTTTAAATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGA GGAATK»</p>	4	<p>«AAWTTAAGSGGGGSGKGGARSCTC CAGSSTTGCKGARTTATTCACCCCTGTCTTTGCGK ACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTGCCACACACTAGGA CAACATTAACCTTTTGKAATTGCAATCAGCGTCAGTA ACAAATTAATTAATTACAACCTTCAACAACGGATCTTG GTTCTGGATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATA AGTAGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCG ATGCTGTTCGAGCGTCATTGTACCTCAAGCTTTGC TTGGTGTGGGCGTCTGTCTAGCTTTGCTGGAGA CTGCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCTACTGGTTTC GAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAAGT CTAGCATCATTAAAGCTTTTTCAACTTTTGACCTCG GATCAGGTAGGGAATACCCGCTGGACTTAAGCATATCA ATAAGCGGAGGGA»</p>
	<p>«AATCCGGGCGAGGCGGCGGSCGGGCTACGGA GCGGKGACAAAAGCCCCATACGCTCAGAGACCGG ACGGGTTGCCGCGCTGCCCTTTGCGGCCGCTCCC CCGGGATCGGGGACGCGGCGCCCAACACACAAAGC CGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGC ATGCCCCCGGAAATACGAGGGGCGCAATGTGCG TTCAAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCA CATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGAT GCCGGAACCAAGAGATCGTTGTTGAAAGTTTAA ATAATTTCGTTTCACTCAGACTGCAATCTTCAGAC AGAGTTGCGGGGTGTCTTCGCGGGGCGGGGCC CGGAGCGGTGAGCCCCCGGCGCGCAGTAAAGG CGGCCCGCCGAAGCAACAAAGGTAAATTAACAC GGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGGCCCTCACTCG GTAATGATCCTTCGCGCAGGTTCACTACGGAAGG»</p>		<p>«TCCCTACTCCTTCCTYGAACCCGAGGGTCAAAAAGTTG AGAAAAAGGSKTAATGGGAKGCTAGACCTTGTGATA GAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACAGTAGG CCGGCTGCCAATTACTTTAAGCGAGTCTCCACGAAA GCTAGAGACAAGACGCCCCAACACCAAGCAAAAGCTTGA GGGTACAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA ATACCAAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAAGATTGATG ATTCACTGAATTCTGCAATTACACTACTTATCGCATTT CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC GTTGTTGAAAGTTGTAAATTAATTTGTTACTGACGCT GATTGCAATTACAAAAAGTTATGTTGTCTAGTGT GGGCGAACCCACCAAGGAAGCAAGAGTACGCAAAAAG ACAAAGGTGAATTAATTCAGCAAGGCTGTAAACCCGAG AGGTTCCAGCCCGCTTCATATTTGTGTAATGATCCT CCGCAAGGTTCACTACGGAAGG»</p>
	<p><i>Penicillium digitatum</i> Pers.</p>		<p><i>Alternaria alternata</i> Fr.</p>

5	«TTACACCTTCGGGGGAGGGGTCCAGCTTGTG GAGTTATTACCCATGGCTTTTGGGCTCTGTT TCCTGGCGGGTTCGCCGCCACCAGGACCAAA CCATAAACCTTTTGTATTGCAATCAGCGTCAGT AAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAACGGAT CTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCAGCGA AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCCT TTGGTATCCAAAAGGGCATGGCTGTTGAGCGTC ATTGTACCCCTCAAGCTTTGCTGGTGGTGGCG TCCTTGTCTCACGAGACTCGCCTTAAATGATT GGCAGCCGACCTACTGGTTTCGAGCGCAGCAC AATTCCTGCACCTTGAATCAGCCTTGTTGAGCAT CCATCAAGACCACATTTTAACTTTTGACCTCGG ATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATAT CAATAAGCGGGAGGG»	7	«TSGSCCCKTTCCCGARGGRRTGKGCACACCCTGC TCATCCACTCTACACCTGKGCACCTATRGAAGGGGSCA GACGTTGTGAAGSGGGSTCTTACGGAGCTGTAAAGCG GCGTGSCTGTGCCGCTTATACAACTCTATAAAGTA TTAGAATGTATTGCGATGTAACGCATCTATATCAACTT TCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATTAAGTAATGTAATTGCAGAAATTCAG TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGT ATTCGAGGAGCATGCCGTGTTGAGTGTATGAATCTTC AACTTACAGACCTTTGGGGTTGTAGGCTTGACCTTGG AGGCTGTGCGCCGTGTTTGGTGGCTCCTTAATGT ATTAGCTTGATTCTTGGGATCGGCTCTCGTGTGATAA TGTTACGCGCGGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCT AACCGTCTGTTGTGAGACAGCTTATGACCTCTGACCT CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATGC AATAAGCGGAGGA»
			«AAAAAGGCTTYCGGCSCAAAAACKTTCWAMRRKG CGCGGCGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCSYWA GGRATCAAGCTAATACATTTAAGAGAGCGGACCAAAACA CGSGCACAAGSCTCCAAAGKCCAAAGCTACAAACCCGS AAAGKCTGKAAGTTGAAGATTTCAATGRCACCTCAAAACAGG SATGSTCCTCGGAATACCAAGAGCGCAAGKGCCTTCA AAGATTGATGATTCACCTGAATTCGSAATTCACATTACTT ATCGCATTTGCTGCGTTCCTCATCGATGCGAGGCCAAG AGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATATAGATGCGTTACATCG CAATACACATTCTAATACTTATAGAGTTTGTATAAACGC AGGSACAGGCACGCCGCTTACAAGCTCCGTAAGAAGCC CGCTTCACAACGCTCTGGAACCCACAGTAAGTGACAGAGT GTAGAGTGGATGAGCAGGGGTGACACATGCCACGGAAG GSCAGCTACAAACCAGTCAAAACTCGATTAATGATCCTTCC GCAGGTTCACTACGCGGAGG»
	<i>Stemphylium botryosum</i> Wall.		<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.

8	9
<p>«GKGGAARSSCATTTATARCCTAGTTGCKTCGGS GSGCGGCTCCGGGGCGTGCGCCCGGCCAA TTATAGTCTTAGTTGTGAATCGACGTTACATCTG AGTGTCTAAGCGAAGCTGTAACACTTTCAACAA GGATCTCTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAGCAG CGGAACGCGATATGATAGTGAATTGCAGATTCA GTGGATCATCGAATCTTTGAACGACATTGCGCT TCCAGTATCCTGGAGGCGATGCCGTGCCAGCGT CGTTCAACCCTCGAGCCCCGTTGCCCGTGT GGGACGCTGCCAGCTACCTGGGAGCCCCCT AAATGCAGTGGCGTCCCGCAAGTCCAGCCCTT GCGTAGTAATATCATTTCTCGCTCGACGGCTCGC GGGCTTACCAGCCTCGAAACCCCCACAAAGACC GCCCCGGGGCAACGGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGC GGGGGG»</p>	<p>«TGGGGRKGGGKKMCAACCCTTGTGTCGACTC TGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTCGGCGGGG GCCCCGGGTGGACATTTCAAACTCTTGCATACTT GCAGTGTAGTAATTTAATTAAATAATTAAACTTTC AACACGGATCTCTGGTCTCGCATCGATGAAGAA CGACGCGAAATGCGATAGTAATGTAATTGCAGAA TTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCC CCCCGTGATTCCGGGGGCGATGCCGTTCGAGCG TCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGATTGGCG ACGGGTCGCCGGCGCGCTCAAAATCGACCGGGTG GGTCTTTCGTCCTCCAGCGTTGTGAAACTATTG CTAAAGGGTGCCCGGGGAGGCCACGCGTAAACA ACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG ATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAG GAA»</p>
<p>«CSCGCCSGGGGGGCKTTTGCGGGGTTTCG AGGCTGGGACCCCTRAGGCGTCCAGAGCGAGAA TGATATTACTACGCAAAAGGCTGGGACTTGGGGA CCGCCACTGCATTTAGGGGGCTGCCAGGTAGC TGGCAGCGTCCCCAACACCGGGCCACGGGGGC TCGAGGGTTGAAACGACGCTCGGACAGGCATGCC TCCAGGATAC TGGAAGGCGCAATGTGCGTTCAAA GATTGATGATTCACTGAAATTCGCAATTCACACTA CATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCTG GAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAACAGT TCGCTTAGAACACTCAGATGTAAACGTCGATTCACA ACTAAGAGACTATAATTGGCCGGGCGCACGCCC GGAGCGCGCGCGCGAAGCAACTAGGTATTAATGTT TCACAAAAGGGTTATGAGTTGTAAGAGCTGTAATG ATCCCTCCGCGAGGTTACCTACGGAAG»</p>	<p>«CTGGWRWCKCCWMCCTGAAWTCCGAGGKMACCT TAGAAATGGGGTTGKTTACGGCGTGGCTCCCGCG GCRCCCTTAGCGAATAGTTTCCACAACGCTGAGGG GACGAAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCGCGCG GGGACCGCGTCGCCAATACCAAGCGAGGCTTGA GTGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCG GAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAAGATTG ATGATTCACTGAATTTGCAATTACATTACTTATCG CATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAG AGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATTTAATTAAATT TACTACAGACTGCAAAAGTTACGCAAGAGTTGAAATGT CCACCCGGGGCCCCCGCGGAGGCAAGGTCGCC CCGAGGCGAACAGAGTCGACAAACAAAGGTTGTG AACATCCCCGCCCGAGGGCCGGGTCAACTGTAA TGATCCCTCCGCGAGGTTACCTACGGGAG»</p>
<p><i>Acrostalagmus luteoalbus</i> Link.</p>	<p><i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.</p>

10	11
	<p>«GCCCCTCGGGGGGSCCMACCTCCACCCGTGTATACCGTACCTTGTTGCTTCGGCGAGCCCGCCCTTTTACTTTAGGGGGCACAGCGCTCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTGCTGAGTCGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCAAGCGAAATGCCATAATTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA CGCACATTGCACCCCTGGTATTCCGGGGGTATGCC TGTCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTG TGTTGGGTCGTCGCCCGCCAGGGGGACGGGCC GAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGC GTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGCC GGCTGCTGGCCGACGCTGAAAAGCAACCAACTATTTTT CCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA»</p>
<p>«GTGCCCCGGGGGGGGGGSGGACGCCGTGSGCT CCWAARSGRGKGKGTCTTCTACTACGCTTGAGGC AAGACGCCACCGCCGAGGCTTTAAGGGCGKCC GKGAGGACGGGGCCCAATACCAAGCAGAGCTTG AGGKTGAATGRGCTCGAACAGGSATGSCCT CGGAATACCAAGGGSSAATGKSGTTCAAGAT TCGATGATTCACTGRATTTCTGSAATTCACATTACTT ATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAA CCAAGAGATCCGKTGKTGAAGTTTTAGTTATTAA CTGTTTTTCAGACTSGAAGTTGSGTGA CTGAG TTTTATGGKCTCTGGCGGGSGGTGSSCAGSCCT CGAAGGSGCGCGKCGGAGGACCGCGGCCCGC CAAAGCAACAGAGGKAGKACACATTGGGTGGGA GAGKCGAGCCGGAGCTCGAATCAACTCGGTAATG ATCCTTCCGACGKTCACCTACGGGAAGG»</p>	<p>«AATAGGTTGGGKKTGCTTTTCAGCGTCGGCCAGCA GCCGGCKGGRAAAAAGGAGCGGGGACAAAAGCCCC ATACGCTCGAGGACCGGTGCGGKGS CGCGCTGC CTTTCGGSGCCGGCCCCCTGGGGGGGACGACGAC CCAACACACAAGCCGTCTTGAGGGCAGCAATGGC GCTCGACAGGGATACCCCCCGGAATACAGGGGG KGCATGKSGTTCAAGACCTCGRTGATTCACTGAAT TCTGCAATTCACTTAATTATCGSATTTGCTGCGKT CTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGGTGA AAGKTTTAAC TGATTGSGATACAATCGACTCAGACGA CAAAAC TT CAGACAGKGTCA CGTTGGTGTCTCCGG CGAGGGCTGKCGCCCCCTAAAAAGAAAAAGGGCGCG GCTCGCCGAAGCAACAAAGKACGGTATACACGGGT GGGAAGTTGGGCCCCGAGGAGCCCTCACTCMGKAA TGATSCCTCCGACGGTCCCTACGGGAAGGKWG»</p>
<i>Neofusicoccum parvum</i> Pennycook & Samuels.	<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm.

7.2. Provas de extratos crus de plantas e endófito *in vitro*

Quadro 7.2.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whitney para o extrato 482 de *Vaccinium cylindraceum*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

482 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-16,1	15,2	Z	-1,680
			P	0,093
2	15,1	8,4	Z	-2,415
			P	0,016
3	-6,9	10,2	Z	-1,260
			P	0,208
4	1,42	35,6	Z	-0,315
			P	0,753
10	-7,0	5,7	Z	-1,470
			P	0,141

Quadro 7.2.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whitney para o extrato 485 de *Lobelia urens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

485 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-9,1	15,8	Z	-1,155
			P	0,248
2	7,1	7,7	Z	-1,260
			P	0,208
3	6,1	9	Z	-1,104
			P	0,270
4	-10,7	15	Z	-0,420
			P	0,674
10	5,3	6,1	Z	-0,893
			P	0,372

Quadro 7.2.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 486 de *Phytolacca americana*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

486 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-24,6	22,3	Z	-2,415
			P	0,016
2	12,9	8,3	Z	-1,995
			P	0,046
3	31,4	7,1	Z	-3,361
			P	0,001
4	-24,6	22,3	Z	-2,205
			P	0,027
10	14,3	10,8	Z	-1,995
			P	0,046

Quadro 7.2.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 487 de *Digitalis purpúrea*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

487 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-8,7	15	Z	-2,415
			P	0,016
2	5,1	13,2	Z	-0,630
			P	0,529
3	-4,1	8,8	Z	-0,840
			P	0,401
4	-8,7	15	Z	-0,210
			P	0,834
10	-7,7	9,5	Z	-1,470
			P	0,141

Quadro 7.2.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 488 de *Agrimonia eupatoria*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

488 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-0,3	19,2	Z	-2,941
			P	0,003
2	5,3	10,3	Z	-0,945
			P	0,345
3	3,8	11,5	Z	-0,841
			P	0,400
4	-0,3	19,2	Z	-0,631
			P	0,528
10	1,8	6,4	Z	-0,105
			P	0,916

Quadro 7.2.6. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 489 de *Lythrum junceum*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

489 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-27,0	18,5	Z	-3,256
			P	0,001
2	22,8	27,2	Z	-2,100
			P	0,036
3	10,6	9,9	Z	-2,100
			P	0,036
4	-27,0	18,5	Z	-1,995
			P	0,046
10	-11,1	11	Z	-1,839
			P	0,066

Quadro 7.2.7. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 491 de *Ilex perado*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

491 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-4,4	18,9	Z	-1,470
			P	0,141
2	15,2	6	Z	-2,838
			P	0,005
3	-9,0	11,2	Z	-1,629
			P	0,103
4	-4,4	18,9	Z	-0,736
			P	0,462
10	-17,7	11,8	Z	-2,626
			P	0,009

Quadro 7.2.8. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 492 de *Laurus novocanariensis*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

492 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	5,5	18,5	Z	-2,731
			P	0,006
2	66,9	5,1	Z	-3,361
			P	0,001
3	-4,3	13,3	Z	-2,521
			P	0,012
4	5,5	18,5	Z	-0,735
			P	0,462
10	1,4	7,6	Z	-0,158
			P	0,875

Quadro 7.2.9. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 494 de *Apollonias barbujana*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

494 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	0,3	27,7	Z	-0,630
			P	0,529
2	3,4	11,5	Z	-1,155
			P	0,248
3	1,6	7,6	Z	-0,735
			P	0,462
4	0,3	27,7	Z	-0,105
			P	0,916
10	-15,1	7,8	Z	-2,626
			P	0,009

Quadro 7.2.10. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 497 de *Prunus lusitanica*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

497 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-21,1	16,2	Z	-3,361
			P	0,001
2	4,9	7,9	Z	-0,630
			P	0,529
3	4,9	8,2	Z	-1,155
			P	0,248
4	-21,1	16,2	Z	-1,944
			P	0,052
10	1	10,6	Z	-0,105
			P	0,916

Quadro 7.2.11. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 500 de *Picconia excelsa*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

500 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	13,9	26,1	Z	-3,151
			P	0,002
2	3,2	7,1	Z	-0,735
			P	0,462
3	12	10,9	Z	-2,100
			P	0,036
4	13,9	26,1	Z	-1,262
			P	0,207
10	-4,9	15,3	Z	-0,945
			P	0,345

Quadro 7.2.12. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 483 de *Mentha suaveolens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

483 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	40,7	6,5	Z	-3,361
			P	0,001
2	8	75,8	Z	-0,630
			P	0,529
3	34,6	2,9	Z	-2,836
			P	0,005
4	31	13,9	Z	-3,361
			P	0,001
10	28,7	8	Z	-3,256
			P	0,001

Quadro 7.2.13. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 493 de *Ocotea foetens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

493 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-9,4	24,9	Z	-0,840
			P	0,401
2	2,8	17,3	Z	-0,315
			P	0,753
3	-9,3	9	Z	-0,998
			P	0,318
4	9,5	3,8	Z	-2,155
			P	0,031
10	-39,1	16,9	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.14. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 496 de *Melia azedarach*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

496 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-7,6	16,6	Z	-0,630
			P	0,529
2	0,6	10,1	Z	-0,105
			P	0,916
3	15,5	10,2	Z	-1,890
			P	0,059
4	13,7	17	Z	-1,470
			P	0,141
10	-38,7	17,3	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.15. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 498 de *Myrica faya*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

498 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-9,8	21,9	Z	-0,525
			P	0,600
2	3,3	16,3	Z	-1,890
			P	0,059
3	16,5	11,1	Z	-2,205
			P	0,027
4	11,1	18,3	Z	-0,893
			P	0,372
10	-30,3	36,4	Z	-0,735
			P	0,462

Quadro 7.2.16. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 499 de *Persea indica*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

499 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-12,7	25,1	Z	-0,840
			P	0,401
2	1,1	9,1	Z	-0,525
			P	0,600
3	10,6	12,5	Z	-1,157
			P	0,247
4	-0,6	5,9	Z	-0,420
			P	0,674
10	-16,1	14,6	Z	-2,470
			P	0,014

Quadro 7.2.17. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 178 de *Argyranthemum frutescens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

178 Fungos %inibição STD			Utest	
1	41,4	5	Z	-3,361
			P	0,001
2	25,9	7,8	Z	-3,151
			P	0,002
3	-4,1	10,3	Z	-0,525
			P	0,600
4	-8,2	7,7	Z	-1,785
			P	0,074
10	20,1	6,7	Z	-2,943
			P	0,003

Quadro 7.2.18. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 182 de *Artemisia thuscula*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

182 Fungos %inibição STD			Utest	
1	6,6	10,9	Z	-0,473
			P	0,636
2	13,3	14,4	Z	-1,890
			P	0,059
3	12,4	11,4	Z	-1,995
			P	0,046
4	8,5	10,3	Z	-1,785
			P	0,074
10	-16,5	5,9	Z	-3,256
			P	0,001

Quadro 7.2.19. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 209 de *Argyranthemum broussoneti*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

209 Fungos %inibição STD			Utest	
1	3,9	8,6	Z	-0,105
			P	0,916
2	0,01	11,5	Z	0,000
			P	1,000
3	19,4	10,4	Z	-2,626
			P	0,009
4	4,5	5,6	Z	-1,365
			P	0,172
10	-44,4	12,4	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.20. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 358 de *Argyranthemum frutescens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

358 Fungos %inibição STD			Utest	
1	1,5	9,9	Z	-0,105
			P	0,916
2	0,9	15,4	Z	-0,315
			P	0,753
3	14,1	7,2	Z	-2,415
			P	0,016
4	-13,5	11,2	Z	-2,365
			P	0,018
10	-43,1	24,1	Z	-2,941
			P	0,003

Quadro 7.2.21. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 453 de *Hedychium gardneranum*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

453 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-15,0	13,6	Z	-1,890
			P	0,059
2	-15,2	8,8	Z	-2,100
			P	0,036
3	33	6	Z	-3,363
			P	0,001
4	0,6	7,8	Z	0,000
			P	1,000
10	-50,6	10,3	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.22. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 454 de *Solanum mauritianum*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

454 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-6,7	7,2	Z	-1,680
			P	0,093
2	-15,0	5,2	Z	-2,205
			P	0,027
3	17,7	11,1	Z	-2,521
			P	0,012
4	-7,4	7,7	Z	-1,785
			P	0,074
10	-55,0	14,4	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.23. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 508 de *Persea indica*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

508 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-3,5	10,2	Z	-0,945
			P	0,345
2	-17,5	11,4	Z	-2,310
			P	0,021
3	18,3	10,3	Z	-2,415
			P	0,016
4	1,3	19,1	Z	-0,105
			P	0,916
10	-16,8	13,3	Z	-2,205
			P	0,027

Quadro 7.2.24. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 775 de *Artemisia thuscula*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

775 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-5,3	8,1	Z	-1,365
			P	0,172
2	3	14,3	Z	-0,683
			P	0,495
3	23,8	7,5	Z	-3,256
			P	0,001
4	21,3	7	Z	-3,361
			P	0,001
10	-18,0	10,7	Z	-2,415
			P	0,016

Quadro 7.2.25. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 808 de *Artemisia thuscula*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

808 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	5,2	15,9	Z	-0,420
			P	0,674
2	4,5	9,7	Z	-0,525
			P	0,600
3	24,7	7,9	Z	-2,943
			P	0,003
4	18,2	6,6	Z	-3,048
			P	0,002
10	-29,8	9,1	Z	-3,361
			P	0,001

Quadro 7.2.26. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 1149 de *Nicotiana glauca*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

1149 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	15,1	10,7	Z	-2,100
			P	0,036
2	11,8	9,5	Z	-1,890
			P	0,059
3	29,7	18,9	Z	-2,626
			P	0,009
4	35,5	7,5	Z	-3,361
			P	0,001
10	10,8	13,9	Z	-0,210
			P	0,834

Quadro 7.2.27. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato 1123 do endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

1123	Fungos	%inibição	STD	Utest	
1		31,6	28,2	Z	-2,626
				P	0,009
2		18,1	17	Z	-2,100
				P	0,036
3		40,7	12,4	Z	-3,151
				P	0,002
4		50	4,8	Z	-3,361
				P	0,001
10		4,8	12	Z	-1,210
				P	0,226

7.3. Provas de óleos essenciais vegetais *in vitro*

Quadro 7.3.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 994 de *Hyptis suaveolens*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

994	Fungos	%inibição	STD	Utest	
1		4,6	24,9	Z	-0,315
				P	0,753
2		23,8	36,7	Z	-1,261
				P	0,207
3		10,4	9,4	Z	-1,995
				P	0,046
4		6,8	3,4	Z	-2,626
				P	0,009
10		-2,0	9,1	Z	-0,210
				P	0,834

Quadro 7.3.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 995 de *Melaleuca* sp., das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

995 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-10,9	8,6	Z	-0,525
			P	0,600
2	18	32,5	Z	-0,840
			P	0,401
3	3,6	4,9	Z	-1,680
			P	0,093
4	18,5	6,5	Z	-3,256
			P	0,001
10	0,5	10,6	Z	-0,105
			P	0,916

Quadro 7.3.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 996 de *Ocimum bacillsicus*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

996 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-7,2	15,9	Z	-0,630
			P	0,529
2	-3,8	7,6	Z	-1,365
			P	0,172
3	17,8	8,4	Z	-3,151
			P	0,002
4	15,8	4,5	Z	-3,361
			P	0,001
10	-6,8	9	Z	-1,156
			P	0,248

Quadro 7.3.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 997 de *Callistemon* sp. , das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

997 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-6,0	10	Z	-0,105
			P	0,916
2	2,6	6,1	Z	-0,105
			P	0,916
3	-1,6	7	Z	-0,893
			P	0,372
4	-1,3	5,4	Z	-0,525
			P	0,600
10	-0,8	3,5	Z	-0,525
			P	0,600

Quadro 7.3.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 998 de *Azadirachta indica*, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

998 Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	-17,1	7,2	Z	-1,575
			P	0,115
2	7,5	6,9	Z	-1,260
			P	0,208
3	2,5	10,5	Z	-0,210
			P	0,834
4	0,1	4,1	Z	-0,315
			P	0,753
10	-0,8	12,7	Z	-0,630
			P	0,529

7.4. Provas de fungicidas químicos de referência *in vitro*

Quadro 7.4.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o fungicida zirame, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

zirame	Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	78,2	3,0		H	11,311
				P	0,001
2	80,9	2,7		H	11,311
				P	0,001
3	79,1	2,8		H	11,294
				P	0,001
4	73,6	6,8		H	11,294
				P	0,001
10	83,5	2,0		H	11,294
				P	0,001

Quadro 7.4.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o fungicida metilparabeno, das provas *in vitro*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

metilparabeno	Fungos	%inibição	STD	Utest	
1	70,4	7,9		H	11,294
				P	0,001
2	67,2	12,6		H	11,294
				P	0,001
3	56,6	17,9		H	11,294
				P	0,001
4	71,2	5,3		H	11,311
				P	0,001
10	-33,0	8,3		H	11,294
				P	0,001

7.5. Provas de extratos crus de plantas e endófito e óleos essenciais *in vivo*

Quadro 7.5.1. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whitney para o extrato cru 483 de *Mentha suaveolens*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

483	C				Utest	
	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		
1	1	1	8,5	87,3	Z	-0,340
					P	0,734
2	1	1	-5,1	89,9	Z	-0,495
					P	0,621
3	1	1	31,9	48	Z	-2,959
					P	0,003
4	1	1	1,9	69,5	Z	-0,825
					P	0,410
10	1	1	50,3	17,9	Z	-4,337
					P	0,000

Quadro 7.5.2. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whitney para o extrato cru 808 de *Artemisia thuscula*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

808	C				Utest	
	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		
1	1	1	38,2	72,9	Z	-1,873
					P	0,061
2	1	1	-0,7	78,6	Z	-0,126
					P	0,900
3	1	1	60,8	14,3	Z	-5,734
					P	0,000
4	1	1	33,8	28,8	Z	-3,076
					P	0,002
10	1	1	37,4	31,3	Z	-2,707
					P	0,007

Quadro 7.5.3. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 1149 de *Nicotiana glauca*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

C						
1149	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		Utest
	1	1	5,9	61,9	Z	-0,670
					P	0,503
	2	1	29,3	71,1	Z	-0,766
					P	0,443
	3	1	16,3	31,3	Z	-1,669
					P	0,095
	4	1	33,9	51,7	Z	-3,425
					P	0,001
	10	1	71,3	8,5	Z	-5,870
					P	0,000

Quadro 7.5.4. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o extrato cru 1123 do fungo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

C						
1123	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		Utest
	1	1	10,2	86,9	Z	-0,262
					P	0,793
	2	1	-24,2	91,5	Z	-1,659
					P	0,097
	3	1	2,25	89,3	Z	-1,640
					P	0,101
	4	1	33,5	43,5	Z	-3,134
					P	0,002
	10	1	53,2	34	Z	-4,298
					P	0,000

Quadro 7.5.5. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 994 de *Hyptis suaveolens*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

C						
994	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		Utest
1	1	1	-51,9	93,3	Z	-2,125
					P	0,034
2	1	1	33,1	44,3	Z	-0,437
					P	0,662
3	1	1	45,3	43,6	Z	-4,997
					P	0,000
4	1	1	45	21,6	Z	-4,298
					P	0,000
10	1	1	55,8	19,5	Z	-4,842
					P	0,000

Quadro 7.5.6. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 995 de *Melaleuca* sp., das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

C						
995	Fungos	mg/mL	%inibição	STD		Utest
1	1	1	2,6	63,7	Z	-0,980
					P	0,327
2	1	1	54,6	33,5	Z	-2,008
					P	0,045
3	1	1	10,5	81,1	Z	-2,688
					P	0,007
4	1	1	32,8	27,1	Z	-3,056
					P	0,002
10	1	1	52,6	16,3	Z	-4,395
					P	0,000

Quadro 7.5.7. Percentagens de inibição, desvio padrão e valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-Whithney para o óleo essencial 996 de *Ocimum bacilliscus*, das provas *in vivo*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

996	C				Utest	
	Fungos	mg/mL	%inibição	STD	Z	P
	1	1			Z	
					P	
	2	1			Z	
					P	
	3	1	60,1	25,2	Z	-5,365
					P	0,000
	4	1	27,3	43,1	Z	-2,241
					P	0,025
	10	1	60,4	19,8	Z	-5,113
					P	0,000

7.6. Provas de Mann-Whithney entre extratos crus de plantas e endófito e óleos essenciais e fungicidas químicos de referência

Quadro 7.6.1. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 1 *Neofusicoccum parvum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato / óleo essencial		zirame	metilparabeno
483	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
808	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
1149	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
1123	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
994	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
995	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
996	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001

Quadro 7.6.2. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 2 *Neofusicoccum parvum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato / óleo essencial		Zirame	metilparabeno
483	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
808	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
1149	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
1123	Z	-3,363	-3,256
	P	0,001	0,001
994	Z	-3,366	-3,153
	P	0,001	0,002
995	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001
996	Z	-3,363	-3,361
	P	0,001	0,001

Quadro 7.6.3. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 3 *Penicillium digitatum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato / óleo essencial		zirame	metilparabeno
483	Z	-3,361	-2,205
	P	0,001	0,027
808	Z	-3,363	-2,943
	P	0,001	0,003
1149	Z	-3,361	-2,415
	P	0,001	0,016
1123	Z	-3,361	-1,575
	P	0,001	0,115
994	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001
995	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001
996	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001

Quadro 7.6.4. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 4 *Alternaria alternata*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato / óleo essencial		zirame	metilparabeno
483	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
808	Z	-3,363	-3,366
	P	0,001	0,001
1149	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
1123	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
994	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
995	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001
996	Z	-3,361	-3,363
	P	0,001	0,001

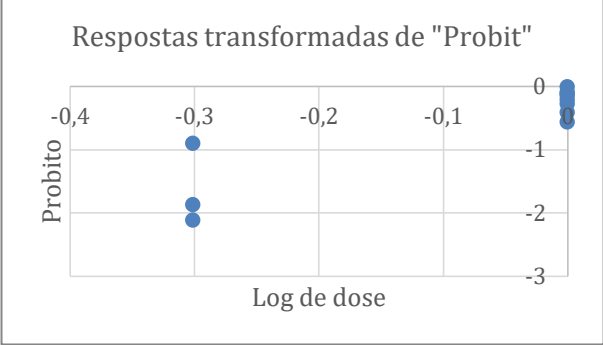
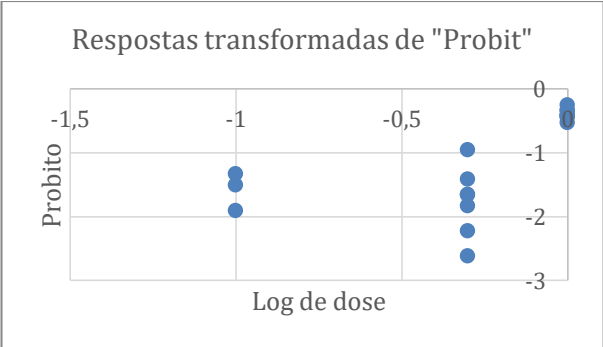
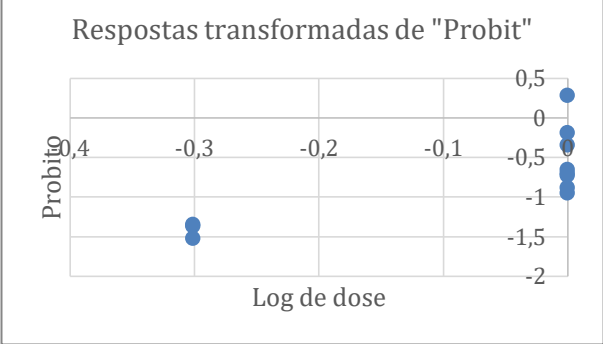
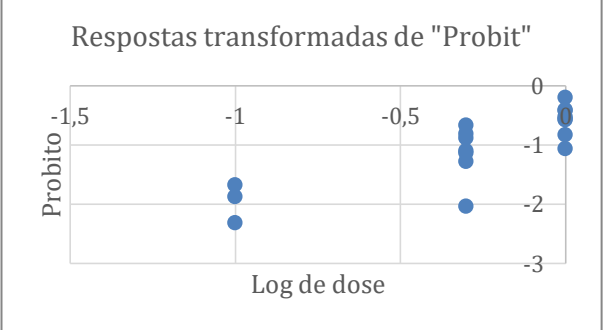
Quadro 7.6.5. Valores de Z e P da análise não paramétrica pela prova de Mann-whithney para comparação entre os produtos de origem biológica testados e os fungicidas de referência, para o Fungo 10 *Neofusicoccum parvum*. Todos os valores com $P < 0,05$ foram sombreados a verde e com $P \geq 0,05$ sombreados a vermelho.

Extrato / óleo essencial		zirame	metilparabeno
483	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001
808	Z	-3,361	-0,630
	P	0,001	0,529
1149	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001
1123	Z	-3,363	-3,363
	P	0,001	0,001
994	Z	-3,361	-3,361
	P	0,001	0,001
995	Z	-3,361	-3,256
	P	0,001	0,001
996	Z	-3,363	-3,363
	P	0,001	0,001

7.7. Curvas de dose-resposta e valores calculados de EC₅₀ e EC₉₀


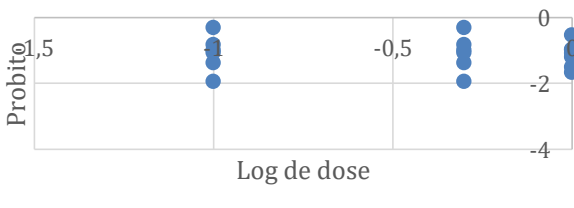
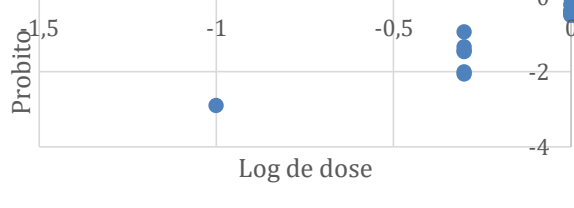
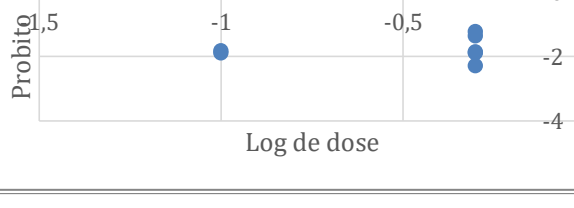
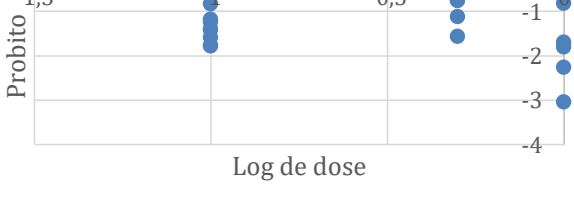
Extrato 483

Quadro 7.7.1. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC₅₀ através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado de EC₅₀ e EC₉₀ para o extrato 483 de *Mentha suaveolens*.

Fungo		EC ₅₀	EC ₉₀
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	1,146 1,013- 1,461	2,406 1,751- 5,427
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	Modelo não ajustado		
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	2,284 1,380- 11,789	14,622 4,708- 838,681
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	1,454 1,110- 12,032	3,823 1,961- 1838,108
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	2,584 1,674- 6,849	20,842 7,559- 230,433

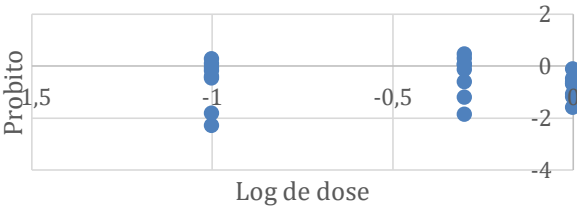
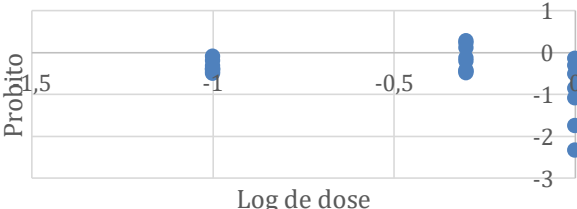
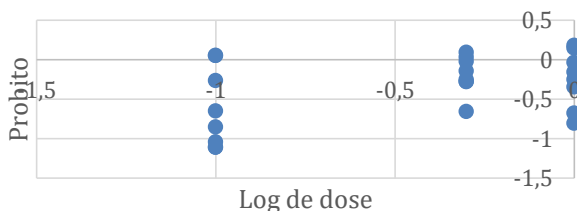
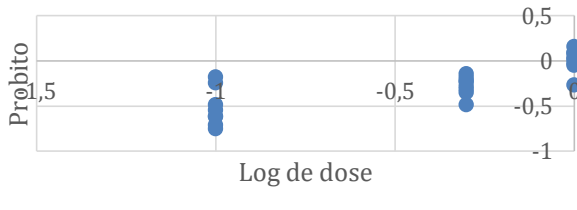
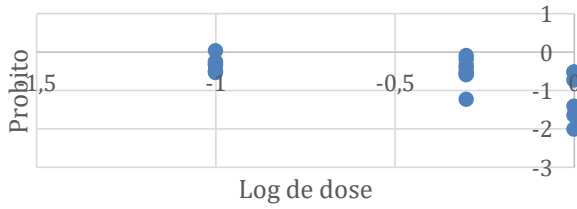
Extrato 1149

Quadro 7.7.2. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose-resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o extrato 1149 de *Nicotiana glauca*.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	1,252 1,088- 1,597	2,862 2,072- 5,344
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	1,542 1,105- 6,118	5,147 2,386- 223,550
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	

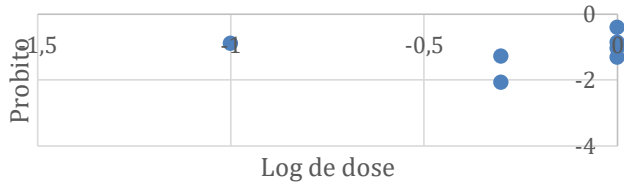

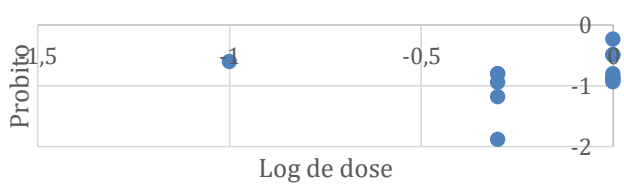
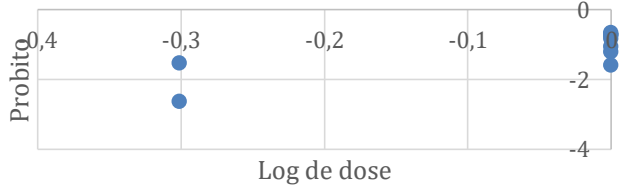

Extrato 1123

Quadro 7.7.3. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o extrato 1123 do fungo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	1,291 0,847- 2,707	Não calculável
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	

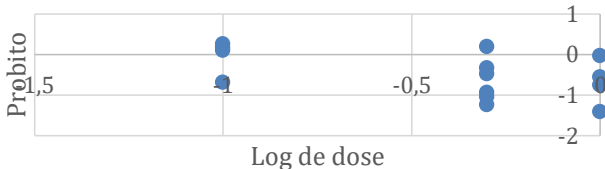
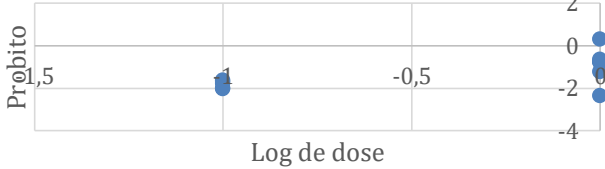
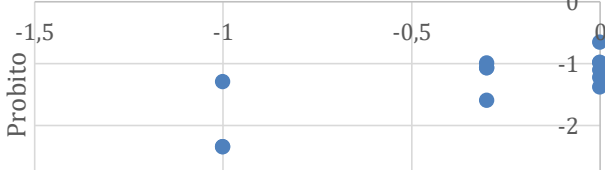
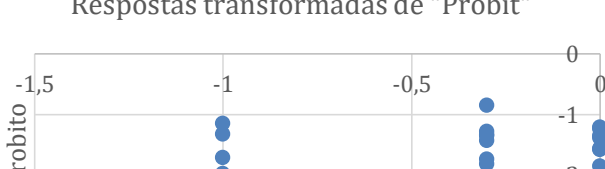
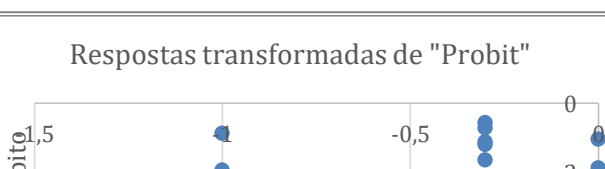
Extrato 808

Quadro 7.7.4. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajuste a curva de dose–resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o extrato 808 de *Artemisia thuscula*.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	


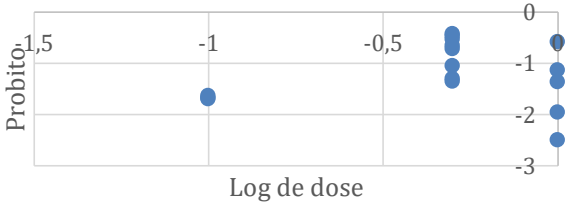
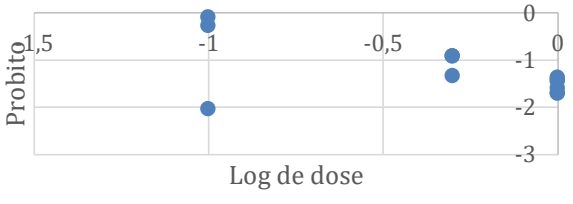
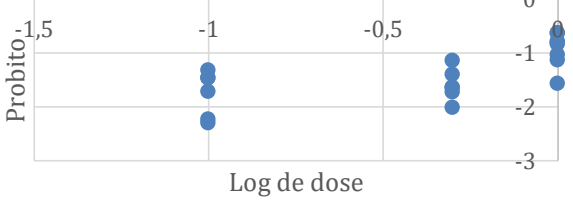
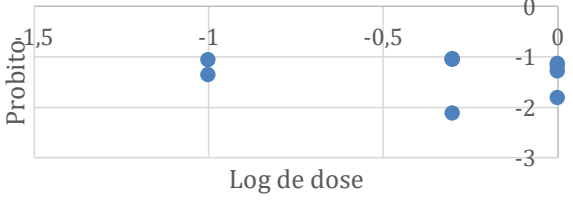
Extrato 994

Quadro 7.7.5. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose-resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o óleo essencial 994 de *Hyptis suaveolens*.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	

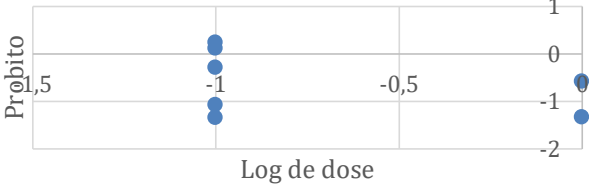


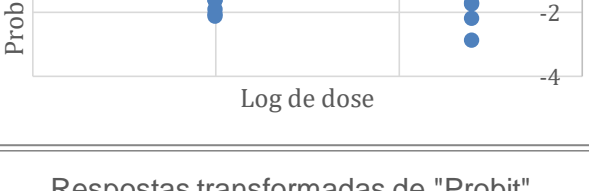

Extrato 995

Quadro 7.7.6. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose-resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o óleo essencial 995 de *Melaleuca* sp.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	

Extrato 996

Quadro 7.7.7. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose-resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o óleo essencial 996 de *Ocimum bacilliscus*.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	Não calculável	



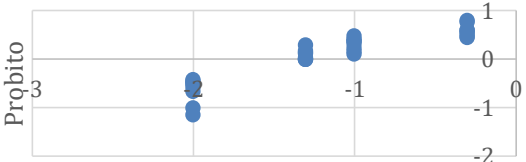
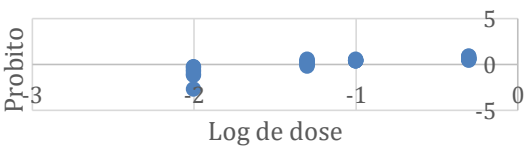

Metilparabeno

Quadro 7.7.8. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose–resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o fungicida metilparabeno.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p>	0,426 0,182- 0,597	3,189 1,640- 44,233
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p>	0,628 0,369- 1,426	9,161 2,922- 333,133
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p>	0,753 0,539- 1,237	7,240 3,191- 45,747
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de probit</p>	0,464 0,381- 0,561	2,263 1,618- 3,767
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	Modelo não ajustado		

Zirame

Quadro 7.7.9. Distribuição de respostas transformadas de "Probit", utilizados para o cálculo de EC_{50} através de ajusta a curva de dose-resposta, valor estimado de EC_{50} e EC_{90} para o fungicida zirame.

Fungo		EC_{50}	EC_{90}
1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	0,139 0,106- 0,189	2,673 1,411- 6,980
2 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	0,075 0,055- 0,100	0,807 0,486- 1,756
3 <i>Penicillium digitatum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	0,055 0,044- 0,068	3,304 1,875- 7,113
4 <i>Alternaria alternata</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	0,051 0,036- 0,070	1,860 0,941- 5,396
10 <i>Neofusicoccum parvum</i>	<p>Respostas transformadas de "Probit"</p> 	0,030 0,012- 0,053	1,791 0,582- 25,065

